

CARCINOEMBRYONALES ANTIGEN (CEA):
EIN VERGLEICH DER RADIO- UND
ENZYMIMMUNOLOGISCHEN BESTIMMUNG
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG
DER FRAGE EINER
METHODENBEDINGTEN ABHÄNGIGKEIT
VON TUMORLOKALISATIONEN
UND CEA-WERTLAGEN

Stefan Pape

1981

AUS DEM INSTITUT FÜR KLINISCHE CHEMIE
AM KLINIKUM GROSSHADERN DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof.Dr.med.M.Knedel

CARCINOEMBRYONALES ANTIGEN (CEA) :

EIN VERGLEICH DER RADIO- UND ENZYMIMMUNOLOGISCHEN BE-
STIMMUNG UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER FRAGE
EINER METHODENBEDINGTEN ABHÄNGIGKEIT VON TUMORLOKALI-
SATIONEN UND CEA-WERTLAGEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Stefan P a p e
aus München

1981

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Fateh-Moghadam
Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Knedel
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.Dez.1981



INHALTSVERZEICHNIS

K A P I T E L 1

EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

K A P I T E L 2

DAS CARCINOEMBRYONALE ANTIGEN (CEA) ,EINE KURZE ÜBERSICHT

- 2.1. Vorkommen
- 2.2. Biochemie
- 2.3. Antigenetische Differenzierung und Beziehung zu anderen Substanzen
 - 2.3.1. Kreuzreaktionen mit Blutgruppensubstanzen
 - 2.3.2. Kreuzreaktionen mit anderen Substanzen
- 2.4. Isolierungsverfahren
- 2.5. Bestimmungsmethoden
 - 2.5.1. Radioimmunologische Verfahren
 - 2.5.1.1. Die FARR-Methode
 - 2.5.1.2. Der Zirconyl-phosphat-gel (Z-Gel) - RIA
 - 2.5.1.3. Der Doppel-Antikörper-RIA
 - 2.5.2. Enzymimmunologisches Verfahren
- 2.6. Klinische Bedeutung

K A P I T E L 3

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

- 3.1. Material
 - 3.1.1. Vorbereitung der Proben
 - 3.1.2. Patienten-Plasmaproben
 - 3.1.3. Referenzkollektiv
- 3.2. Methoden

- 3.2.1. Der CEA (Roche)-Radioimmunoassay
 - 3.2.1.1. Prinzip der Methode
 - 3.2.1.2. Reagenzien
 - 3.2.1.3. Notwendige Laborgeräte
 - 3.2.1.4. Durchführung des Tests
 - 3.2.1.4.1. Durchführung der indirekten Methode
 - 3.2.1.4.2. Durchführung der direkten Methode
 - 3.2.1.5. Auswertung
 - 3.2.1.6. Fehlerquellen des CEA-RIA-Tests
- 3.2.2. Der CEA (Abbott)-Enzymimmunoassay
 - 3.2.2.1. Prinzip der Methode
 - 3.2.2.2. Reagenzien
 - 3.2.2.3. Notwendige Laborgeräte
 - 3.2.2.4. Durchführung des Tests
 - 3.2.2.5. Auswertung
 - 3.2.2.6. Fehlerquellen des CEA-EIA-Tests
- 3.2.3. Statistische Auswertung
 - 3.2.3.1. Methodenvergleich
 - 3.2.3.2. Diagnose-Kollektive
- 3.3. Ergebnisse
 - 3.3.1. Methodische Untersuchungen zum Enzymimmunoassay
 - 3.3.1.1. Nachweisgrenze
 - 3.3.1.2. Meßbereich und Bezugskurve
 - 3.3.1.3. Präzision
 - 3.3.1.3.1. Präzision in der Serie
 - 3.3.1.3.2. Präzision von Tag zu Tag
 - 3.3.1.4. Methodenvergleich
 - 3.3.2. Klinische Ergebnisse
 - 3.3.2.1. Referenzbereich
 - 3.3.2.2. Vergleich der mit beiden Methoden gemessenen CEA-Konzentrationen unter Berücksichtigung der Diagnose
 - 3.3.2.2.1. Mammakarzinom
 - 3.3.2.2.1.1. Mammakarzinom / Tumorstadium 1 bis 4
 - 3.3.2.2.1.2. Mammakarzinom / Tumorstadium 2/3
 - 3.3.2.2.1.3. Mammakarzinom / Tumorstadium 4

K A P I T E L 4

DISKUSSION

- 4.1. Diskussion der methodischen Ergebnisse
 - 4.1.1. Nachweisgrenze und Messbereich
 - 4.1.2. Präzision
 - 4.1.3. Methodenvergleich
 - 4.1.3.1. Diskussion der differenten Untersuchungsergebnisse
 - 4.1.3.1.1. Immunologische Differenzen
 - 4.1.3.1.2. Methodische Differenzen
 - 4.1.3.2. Praktikabilität
- 4.2. Diskussion der klinischen Ergebnisse
 - 4.2.1. Referenzbereich
 - 4.2.2. Vergleich der mit beiden Methoden gemessenen CEA-Konzentrationen unter Berücksichtigung der Diagnose

K A P I T E L 5

ZUSAMMENFASSUNG

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Bereits um die Jahrhundertwende gab es Untersuchungen zur Aufklärung von Zusammenhängen zwischen Immunsystem und malignen Neubildungen.

Basierend auf der Annahme, daß die maligne Entartung eine Veränderung der Zellstruktur mit Bildung von tumorspezifischen Antigenen zur Folge hat, durch die eine Immunreaktion hervorgerufen wird, versuchte man diese krebspezifischen Antigene nachzuweisen und eine Immuntherapie bei malignen Geschwülsten durchzuführen (22).

Grundlage dieser Forschungen war die Transplantationsimmunologie. Die bei den Tumor-Transplantationsversuchen beobachtete Abstoßung des Tumors konnte jedoch nicht auf unterschiedliche Antigenität des Tumorgewebes und des Normalgewebes zurückgeführt werden, da es sich bei den verwendeten Mäusen um genetisch nicht identische Tiere handelte. Die Abstoßungsreaktion konnte Folge einer Immunreaktion gegen die normalen Isoantigene des Transplantats sein (90,89).

Der Nachweis tumorspezifischer Antigene in experimentellen Tumoren gelang erst vor etwa 35 Jahren durch systematische Verwendung genetisch reiner Inzuchtstämme, also von Tieren mit identischen Isoantigenen, wodurch alle gegen die Isoantigene normaler Gewebe gerichteten Immunreaktionen ausgeschaltet werden konnten (33).

Immunisierungsversuche an diesen syngenesischen Versuchstieren zeigten, daß Tiere nach erfolgter Immunisierung mit syngenesischen Tumorzellen ein Transplantat des gleichen Tumors abstießen, während sie ein gleichzeitig übertragenes normales Gewebe des gleichen Spenders annahmen. Damit war nachgewiesen, daß immunisierte Versuchstiere die Tumorzellen dank deren spezieller antigenen Struktur nicht nur von normalen Zellen unterscheiden, sondern sie auch spezifisch zerstören können.

Diese Antigene werden als tumorspezifische Transplantationsantigene (TSTA) bezeichnet (58).

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Antigene chemisch induzierter Tumoren spezifisch für jeden einzelnen Tumor sind (38), während virus-induzierte Tumoren des gleichen Virus antigenetische Verwandtschaft ihrer TSTA aufweisen (105,46,36,80). Im Gegensatz zu diesen tierexperimentellen Forschungsergebnissen mit dem Nachweis tumorspezifischer Transplantationsantigene (TSTA), konnte bis jetzt für menschliche Tumoren ein im strengen Sinne tumorspezifisches Antigen nicht nachgewiesen werden.

Die intensive immunologische Grundlagenforschung der letzten Jahre führte jedoch zur Entdeckung sogenannter tumorassoziierter Antigene (TAA). Dabei handelt es sich um Proteine, die bei an malignen Neubildungen erkrankten Patienten im Tumorgewebe bzw. im Serum in hoher Konzentration vorkommen, bei Normalpersonen jedoch nur in sehr geringer oder nicht nachweisbarer Konzentration auftreten. Allerdings sind diese TAA nicht spezifisch für bestimmte Tumoren (50,79).

Auch wirken die TAA im Gegensatz zu den TSTA nicht als Transplantationsantigen und haben somit auch keine Abstoßungsreaktion zur Folge.

Die zum Teil fehlende Organspezifität der TAA ist einerseits ein Nachteil, da keine spezielle Tumordiagnostik möglich ist, andererseits jedoch auch ein Vorteil, da mit ihrem Nachweis allgemeine Anhaltspunkte für das Vorliegen eines malignen Tumors gegeben werden können.

So können die TAA, gemessen im Blut mit empfindlichen Nachweismethoden, zum direkten serologischen Nachweis vorhandener Tumorzellen und damit zur Tumordiagnostik und besonders zur Therapie- und Verlaufskontrolle bei malignen Tumoren dienen. Zu dieser Gruppe der tumorassozierten Antigene gehören auch die carcinoembryonalen, carcinofetalen oder onkofetalen Antigene. Dabei handelt es sich um Proteine, die in der intrauterinen Entwicklung in fetalen Organen und in der Plazenta gebildet werden und in der letzten Fetalperiode, bzw. nach der Geburt nicht mehr oder nur in sehr geringer Konzentration nachweisbar sind (1,10,12,37,64,67).

Dazu rechnet man auch im weiteren Sinne fetale Enzyme und in Tumoren ektopisch gebildete Hormone.

Eine Erklärung für dieses Wiederauftreten der fetalen Proteine bietet die Hypothese, daß die maligne Transformation eine spezielle Phase der Zellentwicklung repräsentiert, die durch die De-Repression oder Deletion derjenigen Anteile des Genoms charakterisiert ist, die die Synthese entwicklungsphasenspezifischer Proteine steuern. Diese carcinoembryonalen Proteine werden somit bei der Zellregeneration, in embryonalen, placentaren und vitellinen Strukturen sowie in malignen Zellen gefunden.

Zu den biochemisch und immunologisch charakterisierten tumorassoziierten Antigenen gehören u.a. :

a) Carcinoembryonale Proteine:

Alpha-1-Fetoprotein

CEA und kreuzreagierende Proteine

Isoferritin

Basisches Fetoprotein

b) Schwangerschaftsassozierte Proteine:

z.B.: Schwangerschaftsspezifisches

Beta-1-Glykoprotein

Schwangerschaftsassoziertes

Alpha-2-Glykoprotein

Plazenta protein-5

c) Isoenzyme:

Regan-Isoenzym der alkalischen Phosphatase

Fetale Gamma-Glutamyltranspeptidase

d) Hormone:

Beta-Untereinheit des Choriongonadotropins

Calcitonin

Plazentalactogen

Darüberhinaus wurden zahlreiche tumorassoziierte Proteine beschrieben, deren eindeutige Zuordnung infolge fehlender biochemischer und immunologischer Charakterisierung noch nicht möglich ist.

Aus der Gruppe der tumorassoziierten Antigene hat neben dem AFP vor allem das CEA die größte Verbreitung in der klinischen Anwendung bei allgemein anerkannter klinisch-onkologischer Relevanz erfahren.

Bisher erfolgte die Bestimmung der CEA-Konzentration im Blut fast ausschließlich mit radioimmunologischen Verfahren.

Die hiermit verbundene, allgemein bekannte Problematik bezüglich des Umgangs mit radioaktiv markiertem Material, hat zur Entwicklung eines neuen, methodisch einfacheren, enzymimmunologischen CEA-Bestimmungsverfahrens geführt.

Da in diesem Enzymimmunoassay Antigen- und Antikörperpräparationen zur Anwendung kommen, die mit den Radioimmunoassay-Reagenzien nicht identisch sind, war eine Vergleichsuntersuchung zwischen Radioimmunoassay und Enzymimmunoassay von besonderem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit soll anhand von Untersuchungen an 1010 Plasmaproben zu folgenden Fragen Stellung genommen werden:

1. Empfindlichkeit und Meßbereich des Enzymimmunoassays
2. Inter- und Intraassay-Varianz des EIA in verschiedenen Konzentrationsbereichen
3. Referenzbereich des EIA
4. Praktikabilität
5. Vergleichbarkeit des RIA mit dem EIA
6. Vergleich der mit beiden Methoden gemessenen CEA-Konzentrationen unter Berücksichtigung der Diagnose

Einleitend werden die bisher veröffentlichten Forschungsergebnisse bezüglich des Vorkommens, der Eigenschaften, der Isolierungs- und Bestimmungsmethoden und der klinischen Bedeutung des CEA zusammengefaßt.

2. DAS CARCINOEMBRYONALE ANTIGEN (CEA) ,eine kurze Übersicht

2.1. Vorkommen

1965 gelang es GOLD und FREEDMAN (40) mit Hilfe gereinigter Tumorextrakte aus menschlichen Colon-Adeno-Karzinomen in Kaninchen tumorspezifische Antikörper zu erzeugen. Zunächst wurde angenommen, daß es sich um spezifische Tumorantigene bei Colon-Karzinomen handelte, die in normalem Colon-Gewebe fehlen. Bei weiteren Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, daß dieses Antigen sowohl bei Tumoren, ausgehend von Geweben entodermalen Ursprungs des Gastrointestinaltraktes und des Pankreas, als auch in Darm, Leber und Pankreas von Feten im 2.-6. Schwangerschaftsmonat auftritt (39).

Aus diesem Grund nannten GOLD und FREEDMAN dieses Protein carcinoembryonales Antigen.

Immunfluoreszenzmikroskopisch wurde das CEA, auf der Oberfläche

von Tumorzellen nachgewiesen (43). Genauere elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten dann, daß das CEA auf der dem Lumen zugewandten Fläche sowohl von malignen Schleimhautzellen ; als auch von embryonalem entodermalem Epithel nachweisbar ist, und zwar auf der Glykokalix, einer dünnen, kohlenhydratreichen sekretorischen Schicht, die direkt an die Oberflächenmembran angrenzt (44,53).

1969 entwickelte THOMPSON (111) einen Radioimmunoassay zur Bestimmung von CEA im Blut. Durch die folgenden Arbeiten von MOORE (77) konnte mit Hilfe dieser sehr empfindlichen Nachweismethode gezeigt werden, daß erhöhte CEA-Blutspiegel bei einer großen Anzahl gutartiger und bösartiger Erkrankungen - sowohl gastrointestinalen- als auch nicht-gastrointestinalen Ursprungs, z.B. des Magens, Pankreas, Ovars, des Uterus und der Lunge - auftreten (20,76).

Außerdem wurden dann auch geringe Konzentrationen von CEA in gesunden, nicht pathologisch veränderten Erwachsenen-Organen wie Colon, Leber und Lunge (13,9,26,54,73,118), im Plasma (17), Sputum (74) und anderen Körperflüssigkeiten gesunder Erwachsener nachgewiesen (25).

Somit war erwiesen, daß die Unterschiede zwischen Patienten mit malignen Tumoren und Normalpersonen hinsichtlich der CEA-Blutkonzentrationen, wie einleitend erwähnt, eher quantitativer als qualitativer Art sind.

2.2. Biochemie

CEA ist ein Glykoprotein mit leicht variierenden Molekulargewichten, Kohlenhydrat:Proteinverhältnissen und Aminosäure-sowie Monosaccharidbestandteilen (18,29). So ist z.B. von einem Tumor desselben Organs isoliertes CEA chemisch und antigenetisch sehr ähnlich, aber häufig bestehen Unterschiede zu aus anderen Organen isoliertem CEA.

Elektrophoretisch wandert das CEA mit den Beta-Globulinen.

Das Molekulargewicht beträgt zwischen 150 000 und 200 000, der Proteinanteil liegt zwischen 25 und 50 %.

CEA ist löslich in Wasser und 1-molarer Perchlorsäure (60,18, 6,5,19,35,82,110,109,59).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben ergeben, daß das CEA-Molekül aus relativ homogenen, morphologisch unterschiedlichen, gedrehten stabförmigen Partikeln besteht.

Es besteht aus einem Proteinkern von ungefähr 800 Aminosäuren mit zahlreichen hochverzweigten Kohlenhydrat-Seitenketten.

Der Sedimentationskoeffizient liegt zwischen 6.0 und 8.5 (106).

Der Aminosäuregehalt ist - ausgedrückt als Prozentteil des Gesamtproteingehaltes - relativ gleichmäßig (6,110). CEA besteht überwiegend aus Carboxyl- und Hydroxyl-Aminosäuren.

Es sind dies besonders Asparagin- und Glutaminsäure, Threonin und Serin, niedrige Anteile von basischen Aminosäuren und sehr niedrige bis fehlende Anteile schwefelhaltiger Aminosäuren (18). Die N-terminale Aminosäure ist immer Lysin, und die N-terminale Aminosäuresequenz ist bemerkenswert gleichartig für alle Tumor-Präparationen (109,8).

Im Gegensatz dazu ist die Kohlenhydratzusammensetzung aus L-Fucose, D-Mannose, D-Galaktose, Sialinsäure (N-Acetyl-Neuraminsäure), N-Acetyl-D-Glucosamin und N-Acetyl-Galaktosamin höchst variierend (110).

N-Acetyl-D-Glucosamin ist generell in der höchsten Konzentration mit 25 bis 40 % der Gesamtkohlenhydrate vorhanden, während N-Acetyl-Galaktosamin nur in relativ geringen Spuren zu finden ist (4,112).

Die Verteilung und Konzentration der Sialinsäure (N-Acetyl-Neuraminsäure) ist wahrscheinlich für viele der physikalischen und chemischen Unterschiede der Antigen-Präparationen verschiedener Arbeitsgruppen verantwortlich, besonders hinsichtlich des Isoelektrischen Punktes (6). Neuraminidase-Behandlung des CEA bewirkt zwar eine deutliche Veränderung der elektrophoretischen Mobilität (Verschiebung des IEP in den sauren Bereich), ändert jedoch nicht seine antigenetische Identität (18).

Ebenso wird die antigenetische Identität nicht durch Änderungen

im Fucose-, Mannose- und Galaktose-Gehalt beeinflusst (112). Somit würde die spezifische immunodominante CEA-Komponente N-Acetyl-Galaktosamin mit Asparagin und Glutaminsäure enthalten. Trotzdem ist die exakte chemische Natur der antigenetischen Determinante, ob es sich um Protein oder Kohlenhydrate handelt, noch nicht geklärt:

Dafür, daß es sich um Kohlenhydrate handelt, spricht, daß 10 Min. Kochen keinen Einfluß auf die antigenetische Identität hat. Jedoch verliert das CEA-Molekül ca. 90 % seiner Immunreaktivität, wenn es bestimmten Proteasen ausgesetzt wird, was wiederum für eine gewisse Proteinnatur spräche (108).

2.3. Antigenetische Differenzierung und Beziehung zu anderen Substanzen

Das CEA-Molekül ist als immunologisch komplex zu bezeichnen und scheint außer der tumorspezifischen Determinante mehrere andere antigenetische Determinanten zu besitzen (Übersicht bei FATEH-MOGHADAM, 63):

2.3.1. Kreuzreaktionen mit Blutgruppensubstanzen

Zu Kreuzreaktionen mit Blutgruppensubstanzen gibt es verschiedene Erklärungen:

LO GERFO (69) betrachtet die Beziehung zwischen CEA und Blutgruppensubstanzen lediglich als Verunreinigung in CEA-Präparationen.

SIMMONS und PERLMANN (104) vertreten den extremen Standpunkt, daß CEA eine inkomplette Form von Blutgruppensubstanzen des ABO-Systems sei, die durch die genetisch alterierte neoplastische Zelle nicht vervollständigt werden könne.

HOLBURN (51) und GOLD (41,42) glauben, daß die Determinanten der Blutgruppenantigene sich zwar auf dem CEA-Molekül befinden, aber an anderer Stelle als die tumorspezifische Region. Eine andere Erklärung für die Reaktion zwischen CEA und Blutgruppensubstanzen bieten TERRY et al. (110), die annehmen, daß

die antigenetischen Determinanten der Blutgruppensubstanzen und CEA in Wirklichkeit auf verschiedenen Molekülen in den Tumorextrakten lokalisiert sind, aber daß die Blutgruppensubstanzen zusammen mit CEA als nicht-kovalent gebundene Moleküle extrahiert und gereinigt werden.

2.3.2. Kreuzreaktionen mit anderen Substanzen

Weiterhin gibt es noch eine Anzahl höher- und niedriger molekularer Substanzen, die mit CEA kreuzreagieren:

- Antisera gegen das fetale Sulfoglycoprotein-Antigen (FSA), einem Bestandteil, der im Magensaft von 80 % der Patienten mit einem Magenkarzinom gefunden wird, binden signifikant CEA (45).

- Glycoproteine mit Molekulargewichten von ungefähr 60 000, die in Tumoren der Eingeweide und auf vielen normalen Geweben gefunden werden, zeigen Kreuzreaktionen mit CEA.

Diese Substanzen werden mit verschiedenen Namen bezeichnet:

- Normal-Glycoprotein (NGP) (71) oder Carcinoembryonic-Antigen-X (CEX) (23).

- Nonspecific Cross-Reacting Antigen (NCA und NCA₂) (57).

- Colonic-Carcinoma-Antigen (CCEA₂) (113).

- Colon-Carcinoma Antigen III (CCEA III) (84).

- Ein im Mammakarzinom-Gewebe postuliertes, kreuzreagierendes Glycoprotein:

- Breast-Carcinoma-Glycoprotein (BCGP) mit einem Molekulargewicht von 200 000 (61).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es unterschiedliche Substanzen mit CEA-Aktivität gibt. Grund dafür könnten die verschiedenen Gewebsquellen des Antigens und die unterschiedlichen Extraktions-, Isolierungs- und Nachweistechiken sein. Man spricht deshalb jetzt auch von Glycoproteinen mit "CEA-Like-Activity", denen zumindest die immundominante CEA-Antigendeterminante gemeinsam ist.

Eine weitere Ursache der unterschiedlichen Befunde ist in der oben beschriebenen Tatsache begründet, daß auf dem CEA-Molekül neben der spezifischen Immundominante noch weitere Antigen-Determinanten vorkommen, die mit anderen Substanzen kreuzreagieren.

Der spezifische Nachweis des CEA beruht somit darauf, die spezifische immundominante CEA-Komponente nachzuweisen, die N-Acetyl-D-Glucosamin mit Asparagin- und Glutaminsäure enthält.

2.4. Isolierungsverfahren

Unter den verschiedenen Isolierungsmethoden für CEA ist die gebräuchlichste die Extraktion des CEA aus dem Gewebshomogenat durch Zugabe eines gleichen Volumens Perchlorsäure (59) und anschließender Zentrifugation. Danach wird der Extrakt mit Aquadest dialysiert.

Eine ebenfalls gebräuchliche Methode ist die Herstellung einfacher saliner Extrakte aus dem Gewebshomogenat (99).

Die weitere Verarbeitung erfolgt u.a. mittels Gelfiltration oder Elektrophorese, durch isoelektrische Fokussierung, Ultrazentrifugation oder Affinitätschromatographie (Übersicht bei FATEH-MOGHADAM, 63).

2.5. Bestimmungsmethoden

Als Bestimmungsmethoden eignen sich, wegen der auch unter pathologischen Bedingungen nur im unteren ng/ml-Bereich auftretenden CEA-Konzentrationen, neben Immundiffusionsmethoden und dem Hämagglutinations-Hemmungstest (Übersicht bei 63) praktisch nur Immunoassays, die die entsprechend hohe Spezifität und Sensitivität aufweisen.

2.5.1. Radioimmunologische Verfahren

Die radioimmunologischen CEA-Bestimmungsmethoden unterscheiden sich im wesentlichen in den verwendeten CEA-Standardpräparationen, den Antiseren, in der zur Trennung der freien von der gebundenen Radioaktivität angewandten Technik, sowie in der Vorbehandlung der Proben (Perchlorsäureextraktion bzw. direkte Verwendung der Serum-Probe).

Daneben differieren Menge, Konzentration und spezifische Aktivitäten der anderen Reagenzien, sowie Zeitdauer und Temperatur der Inkubation.

Drei radioimmunologische Verfahren wurden bisher vorwiegend verwendet:

2.5.1.1. Die FARR-Methode

Die FARR-Methode, angewandt von THOMPSON et al. war 1969 die erste radioimmunologische Bestimmungsmethode für CEA (30,111). Die Methode erfordert eine Vorextraktion mit Perchlorsäure und anschließende Dialyse zur Entfernung der Perchlorsäure und zur Anhebung des pH in einen neutralen Bereich.

Zur Phasentrennung wird das antikörpergebundene radioaktive CEA bei diesem Assay mit Ammoniumsulfat gefällt.

Der CEA-Standard wurde aus Colon-Ca-Metastasen in der Leber gewonnen und mit Perchlorsäure extrahiert. Das Anti-CEA wurde durch Immunisierung von Ziegen mit gereinigtem CEA erzeugt.

Hauptkritik an diesem RIA ist die technisch schwierige Durchführung, die große Menge benötigten Patientenserums (10 ml / Assay), die komplizierte Probenvorbereitung und die Dauer von 6 Tagen für die gesamte Durchführung des Assays.

2.5.1.2. Der Zirconyl-phosphat-gel (Z-gel)-RIA

Der Z-gel-Radioimmunoassay wurde 1971 erstmals von HANSEN (48) angewandt und fand die weiteste Verbreitung.

Bei diesem Assay wird das an den Antikörper gebundene ^{125}I -CEA

von überschüssigem freiem J^{125} -CEA mit Hilfe von Zirconylphosphat-gel getrennt, welches das antikörpergebundene CEA präzipitiert.

Auch hier wird die Perchlorsäureextraktion mit folgender Dialyse angewandt. Allerdings ist die Dialysezeit stark verkürzt, so daß der Test in 2 Tagen durchgeführt werden kann.

-Modifikationen:

-CHU und REYNOSO (16) reduzierten die Probenmenge auf 1ml und benutzten ausschließlich EDTA-Plasma.

Sie hatten nachweisen können, daß bei Verwendung von Plasma besser reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten sind als bei Verwendung von Serum.

-1973 erfuhr die Hansen-Methode weitere kleinere Modifikationen zur kommerziellen Anwendung in Kit-Form (92):

Die Probenmenge wurde nochmals auf jetzt 0.5 ml reduziert und die Dialysefolge wurde vereinfacht.

Die hier angewandten Reinigungsprozesse zur Isolierung von CEA waren nicht identisch mit denen für die Thompson-Methode (15).

2.5.1.3. Der Doppel-Antikörper-RIA

1972 führten EGAN und TODD (27,28) den Doppel-Antikörper-Test ein.

Der Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit der Verwendung einer direkten Serumprobe ohne vorherige Perchlorsäureextraktion.

Die Trennung des freien vom gebundenen radioaktiven CEA geschieht hier durch einen 2. Antikörper, der den spezifischen Antikörper und daran gebundenes Antigen aus der Lösung fällt. Ein wesentlich höherer Referenzbereich (12.5 ng / ml gegenüber 2.5 ng/ml bei den beiden indirekten Methoden) läßt hier jedoch auf interferierende Substanzen in dem nicht-extrahierten Plasma schließen.

2.5.2. Enzymimmunologisches Verfahren

1978 wurde erstmals ein enzymimmunologisches Verfahren zur Bestimmung von CEA im Blut von ROSE et al. (98) beschrieben.

Methodisch ist ein Enzymimmunoassay analog einem Radioimmunoassay aufgebaut (101). Anstelle eines mit einem Radioisotopen markierten Tracer-Moleküls wird das Antigen (oder der Antikörper) kovalent an ein Enzym gekoppelt und so als Tracer verwendet. Statt der Radioaktivität wird die enzymatische Aktivität gemessen.

Als Enzyme werden pflanzliche oder bakterielle Enzyme verwendet, welche rein, stabil, von hoher spezifischer Aktivität und leicht bestimmbar sind. Sie sollten außerdem in physiologischen Flüssigkeiten nicht oder nur in geringen Aktivitäten vorhanden sein.

Methodisch werden zwei verschiedene Testsysteme des EIA unterschieden:

1.) Der heterogene Enzymimmunoassay (102) :

Bei diesem System wird analog zum RIA die enzymatische Aktivität des Konjugates durch die Antigen-Antikörper-Reaktion nicht beeinflusst.

Dies erfordert vor der Messung der Enzymaktivität eine Trennung des freien vom immunreagenzgebundenen Konjugat.

Die Möglichkeiten zur Trennung der freien von den gebundenen Anteilen sind bei den Enzymimmunoassays im Vergleich zum RIA eingeschränkt. Die als Marker verwendeten Enzyme dürfen bei der Trennung in ihrer enzymatischen Aktivität nicht alteriert werden. Somit kommt z.B. eine Fällung mit Ammoniumsulfat nicht in Frage. Zur Trennung werden deshalb vorwiegend Solid-Phase-Methoden verwendet, d.h. das Antigen oder der primäre oder sekundäre Antikörper werden an Partikel gebunden.

Diese Enzymimmunoassays werden entsprechend auch

ELISA (Enzym-Linked-Immunsorbent-Assay) genannt.

2.) Der homogene Enzymimmunoassay (68) :

Das Charakteristische dieses Verfahrens besteht darin, daß die Aktivität des Marker-Enzyms (im Gegensatz zum heterogenen EIA) durch den Antikörper moduliert wird. Im allgemeinen wird die Aktivität im Hapten/Antikörper-Komplex weitestgehend gehemmt.

Der Trennungsschritt entfällt hier, da die an den Antikörper gebundenen markierten Antigene enzymatisch inaktiv sind.

Dieses Verfahren wird als EMIT-Technik (Enzym-Multiplied-Immunoassay-Technique) bezeichnet und besonders zur Bestimmung von kleinen Molekülen (z.B. Antiepileptika, Opiate) angewandt.

Die Bestimmung von größermolekularen Antigenen (z.B. Proteinen) ist mit dieser Methode erst in jüngster Zeit gelungen.

Bei dem von ROSE et al. beschriebenen CEA-Enzymimmunoassay handelt es sich um einen heterogenen "solid phase" EIA, dem das "Sandwich"-Prinzip zugrunde liegt.

2.6. Klinische Bedeutung

Die ursprünglichen Erwartungen von GOLD, FREEDMAN und THOMPSON, mit der radioimmunologischen Bestimmung von CEA im Blut einen relativ einfachen, klinisch praktikablen und vor allem spezifischen Labortest zum Nachweis von malignen Neubildungen des Verdauungstraktes geschaffen zu haben, haben sich leider nur in ganz beschränktem Maße erfüllt.

Nachfolgende Studien (70, 94, 65) haben gezeigt, daß CEA auch bei verschiedenen anderen Tumoren, bei nicht-malignen (bes. entzündlichen) Erkrankungen (100) und auch bei gesunden Personen (17) im Serum in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden kann.

Aufgrund von Sammelstatistiken, besonders der Roche-Studie (14, 49) mit mehr als 10 000 Patienten unter Anwendung einer modifizierten Hansen-Z-gel-Technik, sowie der 1980 abgehaltenen NIH Consensus Development Conference (85), empfiehlt sich für klinische Fragestellungen, neben einer Referenzbereichsgrenze von 2.5 ng / ml, als klinische Entscheidungsgrenzen 5.0 ng/ml und 10 ng/ml heranzuziehen.

Im einzelnen läßt sich heute folgendes feststellen:

- 1.) Bei Patienten mit Colon-/Rectum-Karzinom liegen die CEA-Konzentrationen in mehr als 70 % der Fälle über 2.5 ng/ml.
Bei 35 % der Fälle lagen die Werte über 10 ng/ml, in Einzelfällen noch wesentlich darüber.
- 2.) Andere Karzinome entodermalen Ursprungs (z.B. Pankreas-, Bronchial-, Magenkarzinom) wiesen Positivitätsraten von etwa gleicher Höhe auf (70 %).
- 3.) Niedrigere Positivitätsraten wiesen Karzinome anderer Gewebe auf:
Besonders das Mammakarzinom mit 45 bis 54 % über 2.5 ng/ml erhöhten CEA-Spiegeln. Allerdings liegen hier die Konzentrationen nur noch in 5 bis 15 % über 10 ng/ml.
- 4.) Nicht-maligne Erkrankungen des Darmes, der Leber und des Pankreas zeigen im allgemeinen niedrigere Positivitätsraten zwischen 16 und 60 %. 70 bis 80 % liegen unter 5 ng/ml (also im niedrig pathologischen Bereich), jedoch in 5 bis 25 % der Fälle liegen die Konzentrationen auch über 5 ng/ml.
- 5.) Gesunde Nichtraucher weisen zu 97 % CEA-Konzentrationen unter 2.5 ng/ml auf, während bei Rauchern die Zahl der Personen mit Werten unter 2.5 ng/ml nur bei 81 % liegt. 15 % der Raucher weisen Werte zwischen 2.5 und 5.0 ng/ml auf.

Auf die Bedeutung der Leberfunktion für die Höhe des CEA-Spiegels hat ZAMCHECK (118) hingewiesen:

Die hohen CEA-Konzentrationen bei Fällen mit gastrointestinalen Tumoren und Leberbefall könnten nicht nur durch eine vermehrte Produktion im Tumor, sondern auch durch verminderten Katabolismus in der Leber und gestörte Ausscheidungsfunktion über die Galle bedingt sein.

Deshalb sollten zur Beurteilung von pathologisch erhöhten CEA-Spiegeln Leberfunktionsuntersuchungen (Bilirubin, AP usw.) durchgeführt werden.

Zusammenfassend läßt sich folgendes über die klinisch-diagnostische Anwendung der CEA-Bestimmung im Blut sagen:

1.) CEA-Bestimmung als diagnostisches Hilfsmittel zur Erkennung einer unbekannten malignen Erkrankung:

- a) Der CEA-Test ist wegen seiner ungenügenden Sensitivität und Spezifität nicht als Screening-Test zur Frühdiagnose maligner Erkrankungen geeignet. Ein normaler CEA-Spiegel schließt eine maligne Erkrankung nicht aus, und leicht bis mäßig erhöhte CEA-Werte sind nicht beweisend für das Vorliegen eines Karzinoms.

Zumindest müssen differentialdiagnostisch benigne Erkrankungen von Darm, Leber und Pankreas ausgeschlossen werden und Rauchgewohnheiten sowie das eventuelle Vorliegen eines Lungenemphysems, entzündlicher Erkrankungen, von Polypen und einer Leberzirrhose berücksichtigt werden.

- b) Allenfalls kann der CEA-Test als zusätzliches diagnostisches Hilfsmittel bei selektierten Patienten mit erhöhtem Krebsrisiko (Darmpolypenträgern, Patienten mit Colitis ulcerosa, Carcinogenexposition etc.) eingesetzt werden.

2.) CEA-Bestimmung bei Patienten mit gesicherten malignen Erkrankungen:

- a) Die wesentliche Bedeutung des CEA-Tests liegt in der

Therapie- und Verlaufskontrolle bei allen Tumorpatienten mit praetherapeutisch erhöhtem CEA-Spiegel. Hierbei handelt es sich vorwiegend um Patienten mit Karzinomen entodermalen Ursprungs (Colon-, Magen- und Pankreaskarzinom) und bei Mamma- sowie Bronchialkarzinom (14,49).

Bei vollständiger Resektion kann im allgemeinen mit einem deutlichen Abfall der CEA-Werte innerhalb von 2 bis 8 Wochen gerechnet werden.

Ein erneuter Anstieg der CEA-Konzentration kann u.U. erster Indikator eines Rezidivs sein (63).

- b) Die CEA-Bestimmung kann bei einigen Tumoren eine prognostische Zusatzinformation beinhalten, da Werte über 20 ng/ml für das Vorliegen von Metastasen sprechen. Allerdings werden Werte in diesem Bereich auch bei Tumoren (z.B. Colon- und Pankreaskarzinom) ohne Metastasierung gefunden (49).

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material

3.1.1. Vorbereitung der Proben

Als Untersuchungsmaterial kommt für die hier durchgeführte radioimmunologische CEA-Bestimmung nur Plasma -das kein Heparin als Antikoagulans enthalten darf- in Frage.

Geronnene oder hämolytische Proben sind für die CEA-Bestimmung mit dem RIA ungeeignet.

Zur Durchführung der hier angewandten enzymimmunologischen CEA-Bestimmungsmethode können sowohl Plasma- als auch Serumproben verwendet werden.

Die Gewinnung der Plasmaproben erfolgte mittels EDTA und Kalium-Sorbat enthaltender Blutentnahmeröhrchen (Vacutainer*). In diese Entnahmeröhrchen werden 8 - 10 ml frisch gewonnenes Blut eingefüllt und anschließend durch einfaches Kippen durchmischt.

Wird das Blut bei Raumtemperatur aufbewahrt, so muß es innerhalb von 6 h nach Gewinnung während 30 min bei ca. 3000 U/min (1000 x g) zentrifugiert werden, bzw. innerhalb von 12 Std., wenn die Probe bei Kühlschranktemperatur (+4°C) gelagert wird. Das so gewonnene Plasma wurde anschließend bei -20°C bis zur jeweiligen Analyse eingefroren.

3.1.2. Patienten-Plasmaproben

Untersucht wurden Plasmaproben von 1010 Patienten. Der CEA-Gehalt jeder Probe wurde sowohl mit dem Radioimmunoassay als auch mit dem Enzymimmunoassay bestimmt.

Bei 534 Patienten war ein maligner Tumor gesichert, bei 476 Patienten aufgrund der vorliegenden klinischen Befunde sehr

* Becton-Dickinson, Freiburg. Best.Nr. 606457

wahrscheinlich.

Zur Abklärung eventueller diagnose-spezifischer Abhängigkeiten wurden die CEA-Wertepaare für 15 Diagnosegruppen getrennt ausgewertet.

3.1.3. Referenzkollektiv

Zur Festlegung des Referenzbereiches des CEA-Enzymimmunoassays wurden die CEA-Konzentrationen von insgesamt 144 Serumproben von klinisch und laborchemisch gesunden Personen bestimmt.

3.2. Methoden

3.2.1. Der CEA (Roche)*-Radioimmunoassay

3.2.1.1. Prinzip der Methode

Die radioimmunologische Bestimmung der CEA-Konzentration erfolgte bei dieser Untersuchung mittels eines kommerziell erhältlichen Test-Kits der Firma Roche*.

Dieser in der klinischen Anwendung am weitesten verbreitete kommerzielle CEA-Test arbeitet -in durch CHU und REYNOSO (16, 92) leicht modifizierter Form- nach der 1971 von HANSEN (48) entwickelten Zirconyl-Phosphat-Gel (Z-gel) Methode.

CEA wird zunächst durch Perchlorsäure aus dem EDTA-Plasma

*ROCHE DIAGNOSTICS, Division of Hoffmann-La-Roche Inc. Nutley, N.J.

extrahiert und dann im ersten Reaktionsschritt mit spezifischem CEA-Antiserum von der Ziege zur Reaktion gebracht. Anschließend wird radioaktiv markiertes (J^{125}) CEA zugegeben, das mit dem überschüssigen CEA-Antiserum reagiert. Das an den Antikörper gebundene J^{125} -CEA wird dann mit Hilfe von Zirconyl-Phosphat-Gel (Z-gel) von überschüssigem freiem J^{125} -CEA abgetrennt und schließlich mit einem Gammazintillationszähler bestimmt.

Das Verhältnis von gebundenem zu freiem J^{125} -CEA ist ein Maß für die ursprünglich im Plasma vorhandene Menge an CEA.

3.2.1.2. Reagenzien

Der CEA-RIA (92) besteht aus folgenden Reagenzien:

1.) EDTA-Puffer

pH 6.25 .Stammlösung,enthaltend Rinderserumalbumin und 0,17 % Natriumazid als Konservierungsmittel.

2.) CEA Standard

Konzentration: 125 ng / ml .

CEA in Natriumborat-Puffer,enthaltend 10 % Humanplasma der Blutgruppe A.

Konservierungsmittel: 0.01 % Thiomersal.

3.) Antiserum

Aktivität: >40 % Proteinbindung.

CEA-Antiserum,gewonnen aus Ziegenserum,adsorbiert an Humanplasma der Blutgruppe A sowie Speichel von Personen der Blutgruppe A und verdünnt mit Natriumboratpuffer.

Konservierungsmittel:0.01 % Thiomersal.

4.) J^{125} -CEA

Spezifische Radioaktivität: 7 - 10 mCi

Konzentration: ca. 50 ng/ml.

J^{125} -CEA in Natriumborat-Puffer,enthaltend

10 % Humanplasma der Blutgruppe A.

Konservierungsmittel: 0.01 % Thiomersal.

5.) Zirconyl-Phosphat-Gel

Z-Gel in Acetatpuffer (0.1 M Acetat), pH 6.25.

Konservierungsmittel: 0.01 % Thiomersal.

6.) Goat Serum

Normales Ziegen Serum für die direkte Methode zur Bestimmung von CEA-Titern über 20 ng/ml.

Konservierungsmittel: 0.01 % Thiomersal.

7.) Kontroll-Seren

Extrakte aus menschlichem Serum, angereichert mit carcinoembryonalem Antigen.

Jede der Proben enthält eine angegebene Menge CEA in 2.0 ml Humanserum.

Konservierungsmittel: 0.01 % Thiomersal.

- | | |
|---------------------------------|----------------|
| a) Kontrolle, Aktivitätsbereich | 0 -2.5 ng/ml |
| b) Kontrolle, Aktivitätsbereich | 2.6-5.0 ng/ml |
| c) Kontrolle, Aktivitätsbereich | 5.1-10.0 ng/ml |
| d) Kontrolle, Aktivitätsbereich | >10.0 ng/ml |

Hilfsreagenzien:

8.) Aqua purificata,

Widerstand mindestens 1×10^6 Ohm, 2 l pro Probe

9.) Perchlorsäure 1.2 M (mol/l)

10.) Physiologische Kochsalzlösung 0.85 %

11.) Ammoniumacetat-Lösung 0.01 M (mol/l) , pH 6.5 ± 0.2

12.) Ammoniumacetat-Lösung 2.5 M (mol/l)

13.) Ammoniumacetat-Lösung 0.1 M (mol/l) , pH 6.25 ± 0.05

3.2.1.3. Notwendige Laborgeräte

1. Teströhrchen 1.5 x 15 cm
2. Pipetten
3. Dispenser für 2.5 ml Z-Gel
4. Ausschwingzentrifuge
5. Vibrationsmischer
6. Gammazähler*

3.2.1.4. Durchführung des Tests

Für die Bestimmung der CEA-Konzentration im Blut mit dem Roche-Radioimmunoassay kommen zwei Methoden zur Anwendung:

- a) Die indirekte Methode zur Messung von CEA-Konzentrationen unter 20 ng/ml,
- b) die direkte Methode zur Bestimmung der CEA-Konzentration von Proben, die bei der indirekten Messung Werte von über 20 ng/ml aufgewiesen haben.

Der wesentliche Unterschied zur indirekten Methode besteht hier darin, daß die Perchlorsäureextraktion entfällt.

3.2.1.4.1. Durchführung der indirekten Methode

1.) Vorbereitung:

Unmittelbar vor Beginn des Tests wird die EDTA-Pufferlösung hergestellt.

Dazu wird die Stammlösung 1:10 mit Aqua purificata verdünnt. Der endgültige pH muß 6.5 ± 0.1 sein.

2.) Kontrollen:

Die Kontroll-Proben müssen bei Bestimmungen nach der indirekten Methode mit jeder Serie mitgeführt werden, sind aber als Kontrolle für Bestimmungen nach der direkten

*LKB, Stockholm, Schweden. WALLAC 1280 ULTRAGAMMA

Methode ungeeignet.

3.) Vorgehen - Plasmaextraktion mit PCA und Dialyse

Wegen interferierender Proteine und Elektrolyte kann die CEA-Bestimmung nach der indirekten Methode nicht im Plasma direkt vorgenommen werden.

Zuvor sind Proteine mit Perchlorsäure (1.2M) auszufällen und zu denaturieren. Säure und Elektrolyte müssen durch Dialyse entfernt werden.

- a) In Doppelansätzen werden jeweils 0.5 ml Plasma in Teströhrchen pipettiert, 2 ml kalte ($2 - 8^{\circ}\text{C}$) physiologische Kochsalzlösung zu jedem Röhrchen gegeben und deren Inhalt mit dem Vibrationsmischer gemischt.
- b) Man gibt in jedes Röhrchen 2.5 ml kalte ($2 - 8^{\circ}\text{C}$) Perchlorsäure 1.2 M, sofort nach Zugabe ist der Inhalt 30 sec. zu mischen.
- c) Die Röhrchen werden 20 min bei ca. 3000 U/min ($1000 \times g$) zentrifugiert.
- d) Die Überstände werden in angefeuchtete Dialyseschläuche dekantiert, diese zugebunden und in ein Dialysebad gebracht, welches mindestens das 50-fache Volumen aller Proben an Aqua purificata (Widerstand mindestens $1 \times 10^6 \text{ Ohm}$) enthält (entsprechend 0.5 l/Probe, wobei sich die Probe aus 0.5 ml Plasma, 2 ml physiologischer Kochsalzlösung und 2.5 ml Perchlorsäure zusammensetzt). Das Wasser muß während der Dialyse fortwährend durchmischt werden.

Dialysebedingungen:

Aqua purificata wird dreimal gewechselt, mit einer Dialysezeit von jeweils mindestens 3 h zwischen den Wechseln (Gesamt-Dialysezeit 12 - 24 Std.).

- e) Nach der Dialyse in Wasser werden die Proben während mindestens 3 Std. und maximal 24 Std. in ein Bad mit dem 50-fachen Volumen aller Proben an Ammoniumacetat-Lösung 0.01 M, pH 6.5 gebracht.

Auf der Reproduzierbarkeit und der Effektivität dieses Dialyseschrittes beruhen vorwiegend die methodischen Schwierigkeiten der bei diesem Test angewandten Hansen-Technik.

So konnte nachgewiesen werden, daß bei steigendem pH-Wert sich eine deutliche Tendenz zu höheren CEA-Werten ergab.

Deshalb kam bei dieser Untersuchung ein vom hiesigen Institut entwickeltes programmgesteuertes Dialysebadsystem zur Anwendung (83).

- f) Der Inhalt der Dialyseschläuche wird zur Bestimmung der CEA-Konzentration in Teströhrchen gebracht. Der pH der so behandelten Probe muß 6.5 ± 0.2 betragen. Andernfalls ist die Dialyse bis zur pH-Einstellung fortzusetzen.
- Die CEA-Bestimmung muß nach Abschluß der Dialyse am gleichen Tag erfolgen.

4.) Vorgehen - Standard-Inhibitionskurve

Zu jeder Serie von Plasmaextrakten muß eine Standard-Inhibitionskurve erstellt werden.

Nach Vorpipettieren von je 5 ml EDTA-Pufferlösung werden 5 Paare von Teströhrchen für die CEA-Standardreihe vorbereitet, in die in Doppelansätzen 0, 10, 25, 50 und 100 μ l des CEA-Standards gegeben werden.

Das entspricht einer CEA-Konzentration von 0, 1.25, 3.125, 6.25 und 12.5 ng/ml.

Der Inhalt aller Röhrchen muß mit dem Vibrationsmischer gemischt werden.

5.) Vorgehen - Bestimmung des CEA-Gehaltes

Für die nun folgenden Schritte werden die Röhrchen mit den Plasmaextrakten und diejenigen für die Erstellung der Standard-Inhibitionskurve genau gleich behandelt.

- a) Zu jedem Röhrchen werden 25 μ l Antiserum gegeben und der Inhalt mit einem Vibrationsmischer gemischt.
- b) Die Röhrchen werden während 30 $\pm$ 1 min in einem thermostabilisierten (45 $\pm$ 1°C) Wasserbad (mit Umwälzung) inkubiert.
- c) Nach Entnahme wird in jedes der Röhrchen 25 μ l J^{125} -CEA gegeben.
Der Inhalt wird mit dem Vibrationsmischer gemischt.
- d) Die Röhrchen werden erneut 30 $\pm$ 1 min im Wasserbad inkubiert.
- e) Nach Inkubation wird sofort jeweils 2.5 ml Zirconyl-Phosphat-Gel zugegeben.
Das Z-Gel muß mit einem automatischen Dosiergerät möglichst rasch zugefügt werden, so daß die Reaktion in allen Röhrchen nahezu gleichzeitig gestoppt wird.
- f) Nach sorgfältigem Mischen wird zur Trennung von freiem und gebundenem Antigen für 5 min bei ca. 3000 U/min (1000 x g) zentrifugiert.
- g) Der Überstand wird sorgfältig dekantiert und der Rand der Röhrchen von Z-Gel-Resten gesäubert.
- h) 5 ml Ammoniumacetat-Lösung 0.1 M werden in jedes Röhrchen gegeben.
- i) Das Gel wird mit dem Vibrationsmischer vollständig dispergiert (es dürfen keine Konglomerate mehr sichtbar sein) und anschließend erneut 5 min bei ca. 3000 U/min (1000 x g) zentrifugiert.
- k) Wiederholung von Schritt g).
- l) Aktivitätsbestimmung des gebundenen J^{125} -CEA in einem Gammaszintillationszähler (Reichtzeit: 1 min).

3.2.1.4.2. Durchführung der direkten Methode

Die direkte Methode zur Bestimmung der CEA-Konzentration im Blut, die angewendet wird, wenn mittels der indirekten Methode eine Konzentration von über 20 ng/ml bestimmt worden ist, wird ohne Perchlorsäureextraktion und Dialyse durchgeführt, da in

diesem CEA-Konzentrationsbereich methodische Interferenzen in unbehandelten Plasmaproben vernachlässigt werden können.

Vorgehen:

- a) Für jedes zu prüfende Plasma werden 4 Teströhrchen vorbereitet, in die jeweils 5 ml Ammoniumacetat-Lösung 0.01 M, pH 6.5 pipettiert werden.
- b) Um einen möglichst großen Konzentrationsbereich zu erfassen, gibt man in 2 Röhrchen je 50 μ l Patientenplasma, in die beiden anderen je 10 μ l Patientenplasma und zusätzlich je 40 μ l Ziegenserum.
- c) 5 Paare von Teströhrchen werden für den CEA-Standard vorbereitet, in die jeweils 5 ml Ammoniumacetat-Lösung 0.01 M, pH 6.5 und 50 μ l Ziegenserum pipettiert werden.
- d) Nach paarweiser Zugabe von 0, 10, 25, 50 und 100 μ l CEA-Standard, entsprechend 0, 1.25, 3.125, 6.25 und 12.5 ng/ml und je 25 μ l Antiserum wird mit dem Vibrationsmischer gemischt.

Das weitere Vorgehen ist unter 3.2.1.4.1. (indirekte Methode-Bestimmung des CEA-Gehaltes) ab Abschnitt b) beschrieben.

3.2.1.5. Auswertung

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe eines Kleincomputers der Firma WANG* unter Berücksichtigung der Zählraten von 0-Wert (Maximalbindung des allein vorhandenen markierten Proteins), Standard- und Analysenlösungen.

Dieser Auswertung liegt das von RODBARD (96) entwickelte Verfahren der linearen Regression nach logit-log-Transformation zugrunde:

Die gemessenen Werte (counts der Standard- und Probenlösungen)

*WANG-Deutschland GmG, Wang 2200 B

werden in Prozent des Nullwertes (B/B(0) %) umgerechnet. Diese Prozentaktivitätswerte werden dann logit-transformiert nach der Formel

$$\text{logit} = \ln \frac{p}{100 - p} .$$

(p = Prozentaktivität)

Auf diese Weise entsteht in einem Koordinatensystem eine lineare Beziehung zwischen den auf der Ordinate in logits aufgetragenen Prozentaktivitätswerten und den zugehörigen logarithmischen Werten der CEA-Konzentrationen auf der Abszisse. Die Bezugsgerade wird durch die Berechnung der linearen Regressionsgeraden aus den Werten der einzelnen Standards nach der Methode der kleinsten Abweichungssquadrate erstellt. Nach Eingabe der Zählraten der je zweifach bestimmten Nullwerte, der Standards und der unbekannten Proben wird von dem Rechner die lineare Regressionsgerade gezeichnet und die errechneten, mit dem Verdünnungsfaktor korrigierten CEA-Konzentrationen ausgedruckt.

3.2.1.6. Fehlerquellen des CEA-RIA-Tests

Wie oben erwähnt, ist der Dialyseschritt methodisch kritisch. Ist die Ionenstärke oder der pH der für die Dialyse verwendeten Pufferlösung zu hoch, werden zu hohe CEA-Werte gefunden (83).

Umgekehrt werden bei zu geringer Ionenstärke oder zu niedrigem pH zu kleine CEA-Werte gefunden.

Eine weitere Fehlerquelle ist ein falscher pH-Wert der EDTA-Puffer-Lösung, die bei der Aufstellung der Inhibitionskurve verwendet wird: Dabei ergeben zu niedriger pH zu hohe, andererseits ein zu hoher pH-Wert zu niedrige CEA-Werte.

Darüberhinaus sind die Inkubationszeiten, insbesondere diejenigen mit ^{125}J -CEA exakt einzuhalten:

Zu niedrige Plasma-CEA-Werte werden gefunden, wenn die Inkubationszeit der Standards (Inhibitionskurve) kürzer als die der unbekannten Proben ist.

Umgekehrt erhält man zu hohe Plasma-CEA-Werte, wenn die Inkubationszeit der Standards länger als die der unbekannten Proben ist.

Die exakte Durchführung der Methode muß daher ständig mit Hilfe der definierten Kontroll-Proben überwacht werden (92). Im Rahmen der internen Qualitätskontrolle werden deshalb zur Überprüfung der Richtigkeit Kontrollserien mit definierten CEA-Konzentrationen mitgeführt, die Präzision wird über eigene Poolproben kontrolliert.

3.2.2. Der CEA (Abbott)*-Enzymimmunoassay

3.2.2.1. Prinzip der Methode

Die zum Methodenvergleich parallel durchgeführte enzymimmunologische Bestimmung der CEA-Konzentration erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Kit der Firma Abbott*.

Bei diesem erstmals von ROSE et al. (98) beschriebenen enzymimmunologischen Verfahren handelt es sich um einen heterogenen "solid-phase" Enzymimmunoassay, dem das "Sandwich"-Prinzip zugrunde liegt (Abb.1).

*Abbott GmbH, Diagnostics Division, Langen/Deutschland

1. Anti-CEA beschichtete Polystyrolkugel



2. Inkubation CEA-Antigen-haltiger Proben mit anti-CEA beschichteten Polystyrolkugeln



w a s c h e n

3. Inkubation mit anti-CEA, markiert mit Enzym (Meerrettich-Peroxidase)



w a s c h e n

4. Inkubation mit Enzymsubstrat (o-Phenylendiamin.2HCL)



Abb.1 : Prinzip des EIA zur Bestimmung von CEA

Die Methode ist (im Gegensatz zum Roche-CEA-RIA) nicht-kompetitiv.

Im ersten Schritt werden Polystyrolkugeln, die mit anti-CEA vom Meerschweinchen beschichtet sind, mit den Proben (Standards, Kontrollen und Patientenproben) inkubiert. Dabei wird in den Proben vorhandenes CEA an das anti-CEA der Kugeln gebunden.

Ungebundenes Material in den Proben wird durch Waschen der Kugeln entfernt.

Anschließend werden die Kugeln mit Meerrettich-Peroxidase-markiertem anti-CEA-(Ziege) inkubiert.

Bei Anwesenheit von CEA in den Proben wird das Konjugat über eine zweite Bindungsstelle des CEA-Moleküls ebenfalls an die Kugeln gebunden.

Nicht gebundenes Konjugat wird wiederum durch Waschen entfernt. Bei der folgenden Inkubation der Kugeln mit dem Enzymsubstrat (o-Phenylendiamin) entsteht eine Färbung, deren Intensität der Menge an gebundenem anti-CEA-Peroxidase-Konjugat proportional ist.

Durch Zusatz von 1 N Salzsäure wird die Enzymreaktion gestoppt. Die Intensität der Färbung wird in einem Spektralphotometer gemessen. Innerhalb des Meßbereiches des Tests ist die Farbin- tensität der CEA-Konzentration proportional.

Trägt man nun die CEA-Konzentration der Standards gegen die Extinktion auf, so erhält man eine Standardkurve. Aus dieser Kurve können schließlich die CEA-Konzentrationen der unbe- kannten Proben und Kontrollen, die zusammen mit den Standards gemessen wurden, abgelesen werden.

3.2.2.2. Reagenzien

Der CEA-EIA-Kit besteht aus folgenden Reagenzien:

- 1.) Extraktionspuffer für CEA
0.2 M Natriumacetat.
Konservierungsmittel: 0.01 % Thiomersal.
- 2.) CEA-Standards
Konzentrationen: 0 , 3 , 10 und 20 ng/ml.
In Acetatpuffer mit Protein stabilisator
und 0.01 % Thiomersal.
- 3.) Anti-CEA-Antikörper
 - a) nicht markiert:
100 mit anti-CEA vom Meerschweinchen be-

schichtete Polystyrolkugeln in TRIS-Puffer.
Konservierungsmittel: 0.1 % Natriumazid.

b) markiert:

Anti-CEA-(Ziege):Peroxidase(Meerrettich)-
Konjugat.

Konzentration mindestens 0.1 $\mu\text{g/ml}$, in TRIS-
Puffer.

Konservierungsmittel: 0.01 % Thiomersal.

4.) Enzymsubstrat

OPD (o-Phenylendiamin • 2 HCL)

5 Gefäße, je 30 mg, aufzulösen mit je 10 ml
Lösungsmittel.

5.) Lösungsmittel für OPD

Citrat-Phosphatpuffer, enthaltend 0.02 % Wasser-
stoffperoxid.

Konservierungsmittel: 0.01 % Thiomersal.

6.) HCL

225 ml 1 N Salzsäure

7.) Kontroll-Serum

15 $\pm$ 5 ng CEA(human)/ml Kälberserum.

3.2.2.3. Notwendige Laborgeräte

1.) Präzisionspipetten für 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.9, 1.0,
2.0 und 10.0 ml.

2.) Automatische Dosiervorrichtung zur Abgabe von Spül-
flüssigkeit.

3.) Absaugvorrichtung zum Waschen der beschichteten Ku-
geln, ausgestattet mit einer Vakuumpumpe und einem
Absauggefäß für die Spülflüssigkeit.

4.) Wasserbad mit Thermostat für $45 \pm 1^\circ\text{C}$ und $70 \pm 1^\circ\text{C}$.

5.) Glasreagenzröhrchen.

6.) Zentrifuge mit einer Drehzahl von 1200 bis 2000 x g.

7.) Vibrationsmischer

8.) Spektralphotometer mit folgenden Leistungsdaten

bei einer Wellenlänge von 492 nm:

Bandbreite: 15 nm oder weniger

Extinktionsbereich: 0 bis mindestens 2 Extinktionseinheiten

Reproduzierbarkeit: mindestens 0.005 Extinktionseinheiten oder 1 %

Linearität oder Richtigkeit: mindestens 0.01 Extinktionseinheiten oder 2 %

Abweichung : höchstens 0.005 Extinktionseinheiten pro Stunde.

3.2.2.4. Durchführung des Tests

1.) Vorbereitung der Proben und der Kontrollseren

(Extraktion des CEA aus Serum bzw. Plasma)

- a) Alle Proben und Reagenzien müssen vor Gebrauch auf Zimmertemperatur gebracht werden.
- b) Das Wasserbad muß auf eine Temperatur von $70 \pm 1^{\circ}\text{C}$ gebracht werden.
- c) In Reagenzgläser werden zu je 0.5 ml der zu bestimmenden Proben und Kontrollseren 1.0 ml Extraktionspuffer pipettiert (Verdünnung 1:3) und mit dem Vibrationsmischer gemischt.
- d) Die Probenröhrchen werden mit einem Plastikfilm verschlossen.
- e) Inkubation der Proben ($15 \text{ min}, 70 \pm 1^{\circ}\text{C}$).
- f) Zentrifugation (10 min, $1200 \times g$).
Vereinzelt treten Proben mit sehr starken Präzipitaten auf. Diese Proben sind dann 10 min mit bis zu $2000 \times g$ zu zentrifugieren.
Bei der Entnahme der Röhrchen aus der Zentrifuge ist

ein Aufwirbeln des Präzipitates zu vermeiden.

2.) Bestimmung des CEA-Gehaltes

- a) Die Temperatur des Wasserbades muß auf $45 \pm 1^\circ\text{C}$ eingestellt werden.
- b) Mit Präzisionspipetten werden nun 0.2 ml der Standards und des Überstandes der vorbereiteten Proben und Kontrollseren in die vorher markierten Vertiefungen der Inkubationsplatten pipettiert.
- c) In jede Vertiefung wird mit einer Pinzette eine der Polystyrólkugeln gebracht (nachdem zuvor die die Kugeln umgebende Flüssigkeit abgetropft ist).
- d) Die Inkubationsplatten werden mit Folie abgedeckt. Dabei ist darauf zu achten, daß die Kugeln vollständig von der Flüssigkeit bedeckt sind.
- e) Inkubation im Wasserbad (2 Std., $45 \pm 1^\circ\text{C}$).
- f) Nach der Inkubation werden die Platten aus dem Bad genommen und die Folien vorsichtig entfernt. Anschließend wird die Probenflüssigkeit aus den Vertiefungen der Platten abgesaugt und jede der Kugeln 2 mal mit 4 - 5 ml entjonisiertem Wasser gewaschen.
 - Der Waschvorgang wurde bei dieser Untersuchung mit einer kommerziell erhältlichen Waschvorrichtung* durchgeführt, mit der je 5 Kugeln gleichzeitig behandelt werden können:
Dabei wird über eine Vakuumpumpe die aspirierte Flüssigkeit in einem Gefäßsystem aufgefangen und gleichzeitig wird die Waschflüssigkeit über eine Pumpe zugeführt.
Der Pentawash wird nun über eine Reihe von 5 Kugeln in die Vertiefungen der Inkubationsplatte gebracht

*PENTAWASHTM II, Fa. Abbott

und die Flüssigkeit abgesaugt.

Mit dem gleichen Gerät wird dann jede Kugel 2 mal mit 4 - 5 ml entjonisiertem Wasser gewaschen und das Wasser anschließend wieder abgesaugt.

Sobald die Waschflüssigkeit aus den Vertiefungen entfernt ist, wird mit den übrigen Kugeln auf die gleiche Weise verfahren.

(Alternativ können auch andere Vorrichtungen für diesen Waschvorgang zur Anwendung kommen)

- g) Zugabe von 0.2 ml anti-CEA-(Ziege)-Peroxidase-(Meerrettich)-Konjugat in jede Vertiefung.
- h) Die Inkubationsplatten werden wieder mit Folien abgedeckt, wobei überprüft wird, daß die Kugeln vollständig von der Flüssigkeit bedeckt sind.
- i) Inkubation der Platten im Wasserbad ($2 \text{ Std.}, 45 \pm 1^\circ\text{C}$).
-Vor dem Ende der Inkubation wird die Enzymsubstrat-Lösung hergestellt:
- k) Mit einer Pipette werden 10 ml OPD-Lösungsmittel in jedes der benötigten OPD-Gefäße gefüllt und durch leichtes Schütteln wird das OPD dann gelöst.
- l) Nach der Inkubation werden die Platten aus dem Wasserbad genommen und die Schutzfolie entfernt.
Die Flüssigkeit wird erneut abgesaugt und die Kugeln werden 2 mal nach dem oben (siehe Punkt f) beschriebenen Verfahren mit 4 - 5 ml entjonisiertem Wasser gewaschen.
- m) Sofort nach diesem Waschgang müssen die Kugeln aus den Inkubationsplatten entnommen werden und in gekennzeichnete Reagenzröhrchen überführt werden.
- n) Mit einer Präzisionspipette wird in jedes der Röhrchen 0.3 ml Substrat (OPD), das entsprechend Schritt k) vorbereitet wurde, dosiert.
- o) Erneute Inkubation ($30 \text{ min.}, 18 - 25^\circ\text{C}$).
(Starke Sonneneinstrahlung ist zu vermeiden)

p) Stoppen der Enzymreaktion durch Zugabe von 2.0 ml der 1 N Salzsäure in jedes der Reagenzröhrchen (30 min nach Einfüllen des Substrates (OPD)).
Anschließend wird der Inhalt jedes Röhrchens mit dem Vibrationsmischer gemischt.

q) Intensitätsmessung der Färbung in einem Spektralphotometer* bei 492 nm. Als leerwert wird destilliertes Wasser verwendet.

(Diese Messung sollte spätestens 2 Std. nach Hinzufügen der Salzsäure erfolgt sein.)

3.) Bestimmung des CEA-Gehaltes von Proben mit mehr als 60 ng CEA / ml :

Werden im ersten Ansatz Proben mit einem CEA-Gehalt von über 60 ng/ml gefunden, so wird der während der Probenvorbereitung nach Hitzebehandlung und anschließender Zentrifugation erhaltene Überstand der betreffenden Probe mit einem geeigneten Volumen des 0 ng/ml-CEA-Standards verdünnt.

Diese verdünnte Probe wird dann entsprechend dem oben beschriebenen Vorgehen in einem neuen Ansatz nochmals bestimmt und der erhaltene Wert mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

3.2.2.5. Auswertung

Die Auswertung des Enzymimmunoassays erfolgte zeichnerisch. Dazu wurden auf linearem Millimeterpapier auf der y-Achse die gemessenen Extinktionen der CEA-Standards gegen die entsprechenden Konzentrationen auf der x-Achse aufgetragen. Die CEA-Konzentrationen des Überstandes der unbekannten Proben

*EPPENDORF Digitalphotometer 6115 S, Fa. Eppendorf, Hamburg

und der Richtigkeitskontrolle entnimmt man dann der Standardkurve.

Die Werte sind mit 3 zu multiplizieren, da bei der Vorbereitung die Proben und die positive Kontrolle 1 : 3 verdünnt wurden. War bei einer der Proben eine weitere Verdünnung erforderlich, um im Meßbereich zu bleiben, muß der abgelesene Wert mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor korrigiert werden.

3.2.2.6. Fehlerquellen des CEA-EIA-Tests

Fehler ergeben sich besonders durch Kontakt des Enzymsubstrates (o-Phenylendiamin) mit oxidierenden Substanzen. Pipetten, welche zum Dosieren des Lösungsmittels des Enzymsubstrates (OPD) bzw. für die 1 N Salzsäure benutzt werden, dürfen keinerlei Metallteile enthalten, da andernfalls die Färbung des Enzymsubstrates beeinflußt wird. Ein weiterer Fehler entsteht, wenn einzelne Kugeln bei den Waschvorgängen (Schritt f und l) austrocknen. Ferner sollte bei der Inkubation des Enzymsubstrates (Schritt o) Sonneneinstrahlung vermieden werden.

3.2.3. Statistische Auswertung

3.2.3.1. Methodenvergleich

Folgende statistische Berechnungen wurden mit einem "Wang"-Kleincomputer* ausgeführt:

- Für die Meßwerte der verschiedenen Kollektive das arithmetische Mittel ($\bar{x}$), die Standardabweichung (s), der Variationskoeffizient (VK), Anzahl (n), die Spannweite (R), sowie die entsprechenden Kennwerte für die Wurzel- und logarithmische Transformation.
- Für größere Kollektive wurden zusätzlich Häufigkeitsverteilungen der CEA-Konzentrationen bzw. Häufigkeitsverteilungen der Konzentrationsdifferenzen der mit beiden Methoden gemessenen CEA-Konzentrationen bestimmt. Für diese Verteilungen wurden zugehörige Parameter wie Mittelwert ($\bar{x}$), Median (x) und Standardabweichung (s) berechnet.
- Zur Prüfung auf Übereinstimmung der Vergleichskollektive wurde der Wilcoxon-Test für Paardifferenzen durchgeführt.
- Für die Korrelation wurde bei annähernder Normalverteilung der CEA-Konzentrationen der lineare Korrelationskoeffizient r ermittelt.

Ferner wurde für die CEA-Wertepaare die standardisierte Hauptkomponenten-Analyse (31) durchgeführt.

Dieses Verfahren kommt dann anstelle der linearen Regression von y auf x oder x auf y zur Anwendung, wenn, wie bei dieser Untersuchung, für keine der beiden Variablen so präzise Werte ermittelt werden können, daß sie praktisch wie Konstante behandelt werden können.

Die standardisierte Hauptkomponenten-Analyse geht davon aus, daß beide Meßverfahren mit zufälligen Fehlern behaftet sind.

*Wang 2200 B, Fa. WANG-Deutschland GmbH

Die standardisierte Hauptkomponente entspricht dem geometrischen Mittel der Regression von y auf x und von x auf y. Dabei berechnet sich die Steigung der Ausgleichsgeraden aus der Streuung der x- und y-Werte:

$$b = \frac{s_y}{s_x}$$

Der Intercept a berechnet sich aus der Formel:

$$a = \bar{y} - b\bar{x} .$$

3.2.3.2. Diagnose-Kollektive

Um Abhängigkeiten von CEA-Wertlagen, Diagnose und Analytik zu prüfen, wurden die CEA-Wertepaare für 15 Diagnosegruppen getrennt ausgewertet (Tab. 1).

Dazu wurden die Patientendaten verschlüsselt und auf Datenerfassungsbögen übertragen. Anhand dieser Bögen wurden entsprechende Lochkarten angefertigt.

Ausgewertet wurden die Daten mit dem "Sammel- und Auswertungssystem volldynamischer Datenbestände"-SAVOD-* auf der Datenverarbeitungsanlage (Siemens 4004/151) des Rechenzentrums für den Fachbereich Medizin am Klinikum Großhadern der Universität München.

Das Programm wurde in FORTRAN IV geschrieben.

* Das Programm wurde erstellt von A. RAAB und H. K. SELBMANN am Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Statistik und Biomathematik (ISB) der Universität München.

DIAGNOSE

FALLZAHL

1. a) Mammakarzinom	86
b) Mammakarzinom, Tumorstadium 2/3	60
c) Mammakarzinom, Tumorstadium 4	26
2. Gastrointestinale Tumoren	249
3. Kolon-Rektumkarzinome	159
4. Entzündliche Darmerkrankungen	43
5. Darm-Polypen	10
6. Maligne abdominale Neubildung (nicht klass.)	31
7. Leberkarzinom	32
8. Leberzirrhose	18
9. Gallenblasenkarzinom	9
10. Pankreaskarzinom	28
11. Prostatakarzinom	15
12. Gynäkologische Tumoren	17
13. Bronchialkarzinom	26
14. Klinisch gesicherter maligner Tumor (nicht klass.)	27
15. Verdacht auf maligne Neubildung	90

Tab.1 : Übersicht über die ausgewerteten Diagnosegruppen

Für jede Diagnosegruppe wurden getrennt sowohl die im direkten Meßbereich beider Methoden liegenden CEA-Werte unter 20 ng/ml, als auch -bei ausreichender Fallzahl- nur Werte über der Referenzbereichsgrenze des RIA von über 2.5 ng/ml verglichen (hier wurde wegen der besseren Übersichtlichkeit die logarithmische Darstellung der CEA-Wertepaare gewählt).

Dabei wurden für jede der Diagnosegruppen folgende Parameter berechnet:

1. Der Korrelationskoeffizient
2. Die Ausgleichsgerade als standardisierte Hauptkomponente
3. Der Mittelwert der Konzentrationsdifferenzen

Daneben wurde zur Prüfung auf Übereinstimmung der Vergleichskollektive der Wilcoxon-Test durchgeführt.

3.3. ERGEBNISSE

3.3.1. Methodische Untersuchungen zum Enzymimmunoassay

3.3.1.1. Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze des CEA-Enzymimmunoassays, berechnet aus der 3-fachen Standardabweichung des 0-Wertes in 15 Assays, betrug 0.5 ng/ml.

3.3.1.2. Meßbereich und Bezugskurve

Der Meßbereich des CEA-Enzymimmunoassays liegt zwischen 0.5 und 60 ng/ml. CEA-Konzentrationen über 60 ng/ml müssen mit entsprechender Menge von Nullstandard verdünnt werden. Die Bezugskurve (Abb. 2), erstellt mit verschiedenen Standards des CEA-EIA-Tests bzw. deren Verdünnungen mit entsprechenden Mengen Nullstandards (Tab. 2), zeigt eine nicht über den gesamten Meßbereich lineare Beziehung zwischen

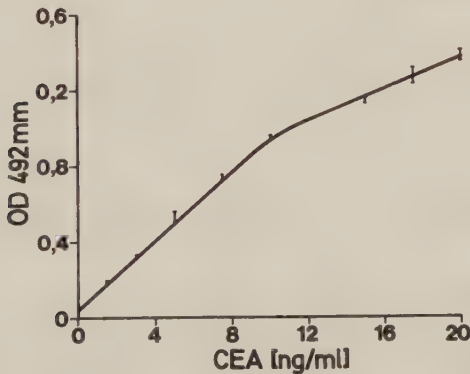


Abb. 2 : Bezugskurve des CEA-EIA

CEA-Konzentration und Extinktion. Im Bereich zwischen 8-12 ng/ml flacht die im unteren Konzentrationsbereich (0-8 ng/ml) lineare Bezugskurve ab.

CEA-Konzentration (ng/ml)	E. bei 492 nm
0	0.035
1.5	0.175
3	0.325
5	0.530
7.5	0.740
10	0.945
15	1.145
17.5	1.273
20	1.380

Tab. 2 : Extinktionen der verwendeten CEA-Standards und der durch Verdünnung der Standards hergestellten CEA-Konzentrationen

3.3.1.3. Präzision

Die Präzision der Methode wurde mit selbst hergestellten Pool-Seren für verschiedene Konzentrationsbereiche getrennt geprüft:

MATERIAL	N	MW NG/ML	S NG/ML	VK %
SERUM 1	15	2.24	0.15	6.9
SERUM 2	15	11.9	0.51	4.3

Tab. 3 : Intra-Assay-Varianz

3.3.1.3.1. Präzision in der Serie

Der Variationskoeffizient der Intra-Assay-Varianz betrug 6.9% im niedrigen CEA-Konzentrationsbereich (2.24 ng/ml) und 4.3% bei einer mittleren Konzentration (11.9 ng/ml)(Tab. 3).

3.3.1.3.2. Präzision von Tag zu Tag

Bei einer niedrigen CEA-Konzentration von 1.28 ng/ml betrug der Variationskoeffizient 21.8 %, im mittleren Konzentrationsbereich (8.9 ng/ml) 8.6 % und im hohen Konzentrationsbereich (18.9 ng/ml) 6.4 % (Tab. 4).

MATERIAL	N	MW NG/ML	S NG/ML	VK %
SERUM 1	19	1.28	0.28	21.8
SERUM 2	19	8.9	0.76	8.6
SERUM 3	19	18.9	1.21	6.4

Tab. 4 : Inter-Assay-Varianz

3.3.1.4. Methodenvergleich

Wurden nur die im direkten Meßbereich beider Methoden liegenden CEA-Werte (n = 900) unter 20 ng/ml berücksichtigt, so bestand zwischen dem RIA und dem EIA eine Korrelation von 0.72 . Die Steigung der standardisierten Hauptkomponentengeraden betrug 1.02 , der Intercept 0.87 (Abb. 3).

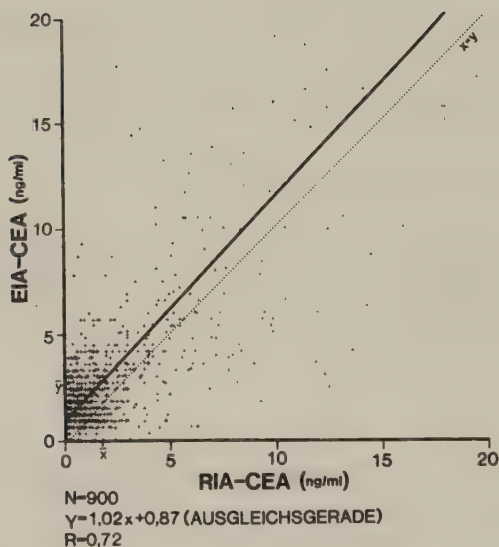


Abb. 3 : Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-Werten im Konzentrationsbereich unter 20 ng/ml

Wurden andererseits nur CEA-Werte über der Referenzbereichsgrenze des RIA von über 2.5 ng/ml ($n = 230$) verglichen, so betrug der Korrelationskoeffizient 0.61, die Steigung der standardisierten Hauptkomponentengeraden lag bei 0.81 und der Intercept bei 3.17 (Abb. 4).

Die logarithmische Darstellung wurde wegen der besseren Übersichtlichkeit gewählt.

In Abb. 5 ist die Häufigkeitsverteilung der Differenzen der mit dem RIA und dem EIA gemessenen CEA-Konzentrationen dargestellt.

Im Mittel lagen für den Bereich von 0 - 20 ng/ml die mit dem RIA erhaltenen Werte um 1 ng/ml niedriger. Der Streubereich betrug -16 bis +9 ng/ml.

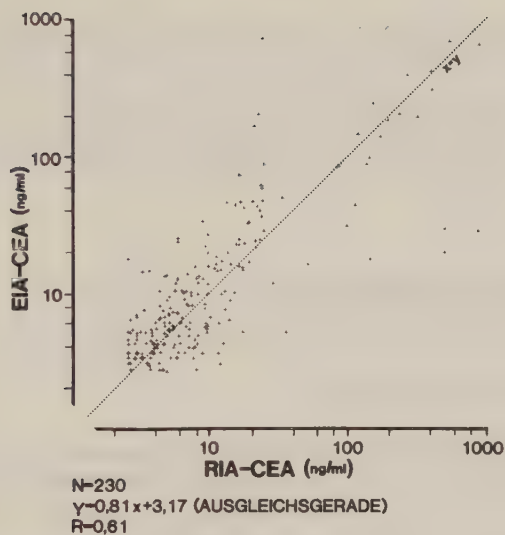


Abb. 4 : Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-Werten im Konzentrationsbereich über 2.5 ng/ml

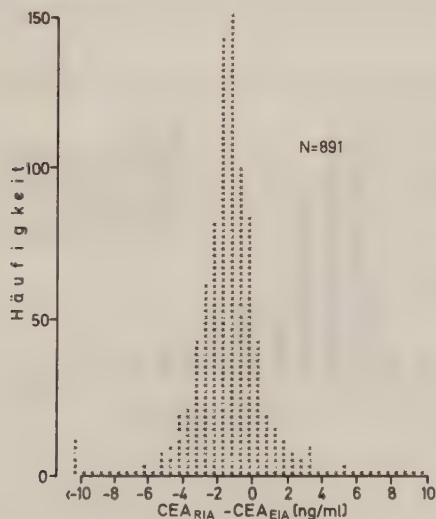


Abb. 5 : Häufigkeitsverteilung der CEA-Konzentrationsdifferenzen identischer Proben nach radioimmunologischer und enzymimmunologischer Bestimmung

In 191 Proben wurden mit dem EIA deutlich pathologische Werte über 5 ng/ml gefunden, während mit dem RIA im Referenzbereich liegende Werte ermittelt wurden.

Dagegen wurden nur in 11 Seren mit dem Radioimmunoassay pathologische Werte und mit dem Enzymimmunoassay normale Werte gefunden.

3.3.2. Klinische Ergebnisse

3.3.2.1. Referenzbereich

Aus der Bestimmung der CEA-Konzentration mit dem Enzymimmunoassay in Seren von 144 klinisch und laborchemisch gesunden Personen ergab sich entsprechend der 2.5- und der 97.5 % Perzentile ein Referenzbereich zwischen 0.3 und 3.0 ng/ml (Abb. 6).

Bei 130 Seren (entsprechend 93 %) des Normalkollektives wurden CEA-Konzentrationen unter 2.5 ng/ml gemessen.

Wie aus der Häufigkeitsverteilung ersichtlich, sind die

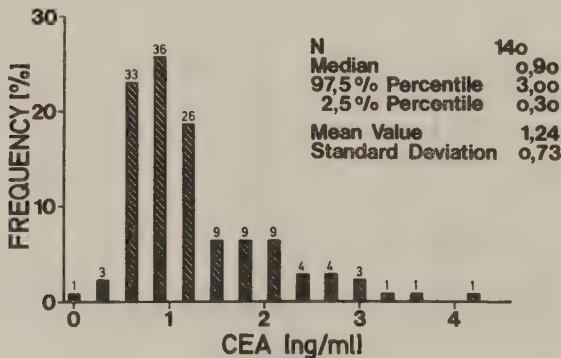


Abb. 6: Häufigkeitsverteilung der in einem Referenzkollektiv mittels EIA ermittelten CEA-Werte

CEA-Konzentrationen nicht normal-verteilt. Der Median lag bei 0.9 ng CEA/ml.

Die CEA-Konzentrationen von 9 Seren (entsprechend 6.5 %) lagen zwischen 2.5 und 3.6 ng/ml; 1 Serum des Normalkollektives hatte einen CEA-Gehalt von 4.3 ng/ml.

3.3.2.2. Vergleich der mit beiden Methoden gemessenen CEA-Konzentrationen unter Berücksichtigung der Diagnose

Zur Abklärung eventueller diagnose-spezifischer Abhängigkeiten wurden die CEA-Wertepaare getrennt für 15 Diagnosegruppen mit höheren Fallzahlen untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im folgenden dargestellt:

3.3.2.2.1. Mammakarzinom

3.3.2.2.1.1. Mammakarzinom/Tumorstadium 1 bis 4

Bei Berücksichtigung der im direkten Meßbereich beider Methoden liegenden CEA-Werte unter 20 ng/ml ($n = 74$) betrug der Korrelationskoeffizient 0.78, die Steigung der Hauptkomponentengeraden 1.4 und der Intercept 0.57 (Abb. 7).

Im Mittel lagen die mit dem RIA erhaltenen Werte um 1.43 ng/ml niedriger als die mit dem EIA gemessenen Werte (Abb. 8) (Streubereich: -15 bis +3.7).

In 5 Fällen wurden mit dem EIA deutlich pathologische Werte über 4 ng/ml gefunden, während mit dem RIA im Referenzbereich liegende Werte ermittelt wurden.

Dagegen wurde nur in einem Serum mit dem RIA ein pathologischer Wert und mit dem EIA ein im Referenzbereich liegender Wert gefunden.

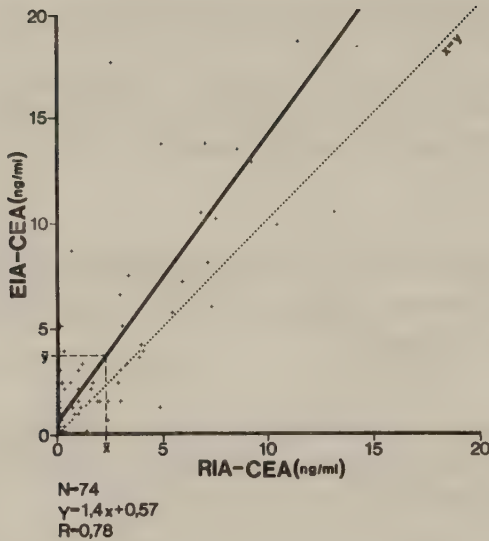


Abb. 7 : Mammakarzinom

Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-Werten
im Konzentrationsbereich unter 20 ng/ml

Der Wilcoxon-Paardifferenzentest ergab einen signifikanten Unterschied beider Methoden ($p = 0.00$).

Wurden nur Werte über der Referenzbereichsgrenze des RIA von über 2.5 ng/ml ($n = 32$) verglichen, so betrug der Korrelationskoeffizient 0.99, die Steigung der Hauptkomponentengeraden 0.89 und der Intercept 6.5 (Abb. 9).

Der Wilcoxon-Paardifferenzentest ergab auch hier einen signifikanten Unterschied beider Methoden ($p = 0.02$).

3.3.2.2.1.2. Mammakarzinom/Tumorstadium 2/3

Wurden nur Patientinnen mit Mammakarzinom Stadium 2 und 3 verglichen, so betrug der Korrelationskoeffizient der mit beiden Methoden gemessenen und unter 20 ng/ml liegenden CEA-Werte

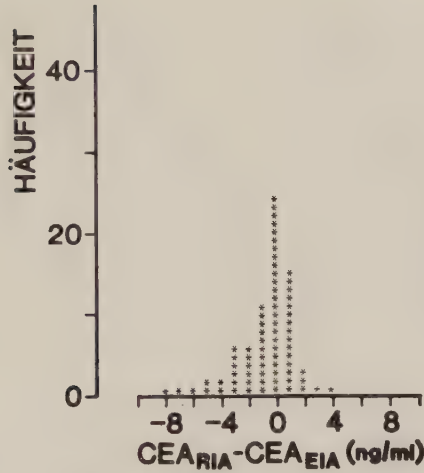


Abb. 8 :Mammakarzinom: Häufigkeitsverteilung der CEA-Konzentrationsdifferenzen identischer Proben nach radioimmunologischer und enzymimmunologischer Bestimmung

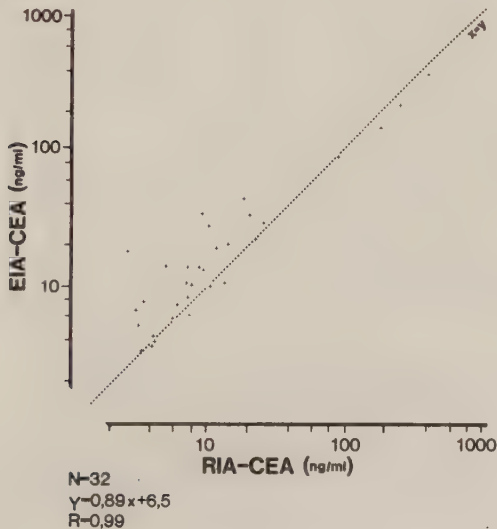


Abb. 9 :Mammakarzinom: Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-Werten im Konzentrationsbereich über 2.5 ng/ml

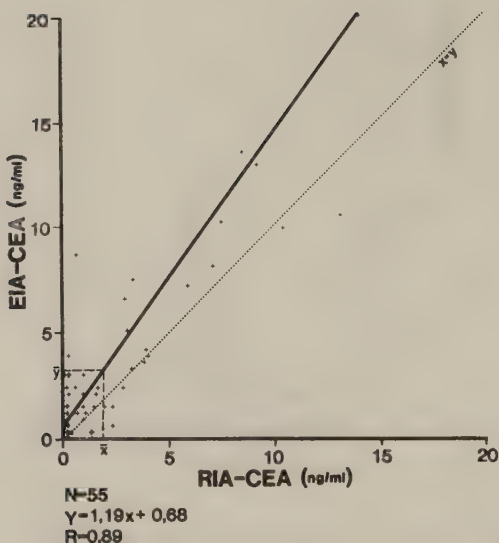


Abb. 10 : Mammakarzinom, Tumorstadium 2/3

Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-
Werten im Konzentrationsbereich unter 20 ng/ml

($n = 55$) 0.89, die Steigung der Hauptkomponentengeraden 1.19 und der Intercept 0.68 (Abb. 10).

Die mit dem RIA erhaltenen Werte lagen im Durchschnitt um 1.17 ng/ml niedriger als die mit dem EIA erhaltenen Werte (Abb. 11) (Streubereich: -8 bis +2.8).

Der Wilcoxon-Paardifferenzentest ergab einen signifikanten Unterschied beider Methoden ($p = 0.00$).

3.3.2.2.1.3. Mammakarzinom/Tumorstadium 4

Der Korrelationskoeffizient betrug hier bei CEA-Werten unter 20 ng/ml ($n = 19$) 0.73 , die Steigung der Hauptkomponentengeraden 1.8 und der Intercept 0.2 (Abb. 12).

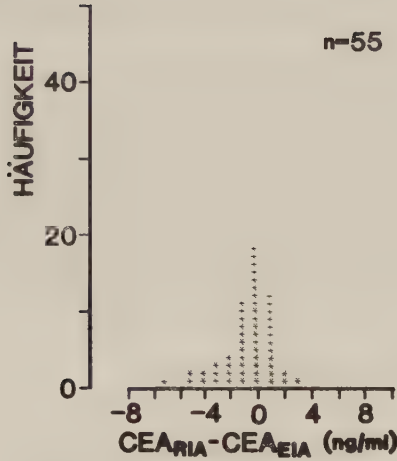


Abb. 11: Mammakarzinom, Tumorstadium 2/3: Häufigkeitsverteilung der CEA-Konzentrationsdifferenzen identischer Proben nach radioimmunologischer und enzymimmunologischer Bestimmung

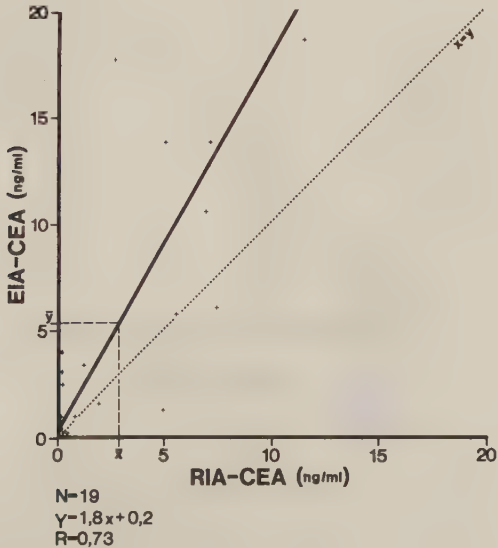


Abb. 12: Mammakarzinom, Tumorstadium 4: Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-Werten im Konzentrationsbereich unter 20 ng/ml

Im Durchschnitt lagen die mit dem RIA erhaltenen Werte um 2.5 ng/ml niedriger als die mit dem EIA erhaltenen Werte (Streubereich -15 bis +3.7).

Der Wilcoxon-Paardifferenzentest ergab auch hier einen signifikanten Unterschied beider Methoden ($p = 0.009$).

Bei Werten über der Referenzbereichsgrenze des RIA von über 2.5 ng/ml ($n = 13$) betrug der Korrelationskoeffizient 0.99, die Steigung der Ausgleichsgeraden 0.78 und der Intercept 12.2.

Der Wilcoxon-Paardifferenzentest ergab hier keinen signifikanten Unterschied beider Methoden ($p = 0.14$).

3.3.2.2.2. Gastrointestinale Tumoren

Bei CEA-Werten ($n = 228$) im direkten Meßbereich beider Methoden (< 20 ng/ml) betrug der Korrelationskoeffizient 0.68, die

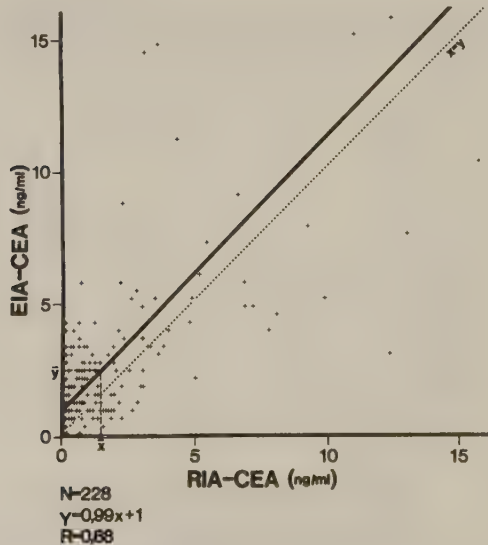


Abb. 13 : Gastrointestinale Tumoren:

Vergleichsdarstellung von CEA-RIA und CEA-EIA-Werten
im Konzentrationsbereich unter 20 ng/ml

Steigung der Hauptkomponentengeraden 0.99 und der Intercept 1 (Abb. 13).

Im Mittel lagen die mit dem RIA erhaltenen Werte um 0.9 ng/ml niedriger als die mit dem EIA erhaltenen Werte (Abb. 14) (Streubereich -11 bis +9.3).

Bei 7 klinisch gesicherten Karzinomen wurden mit dem EIA deutlich pathologische Werte über 4 ng/ml gefunden, während mit dem RIA im Referenzbereich liegende Werte ermittelt wurden.

Andererseits wurde nur in einem Serum (klinisch gesichertes Karzinom) mit dem RIA ein pathologischer Wert und mit dem EIA ein im Normalbereich liegender Wert gefunden.

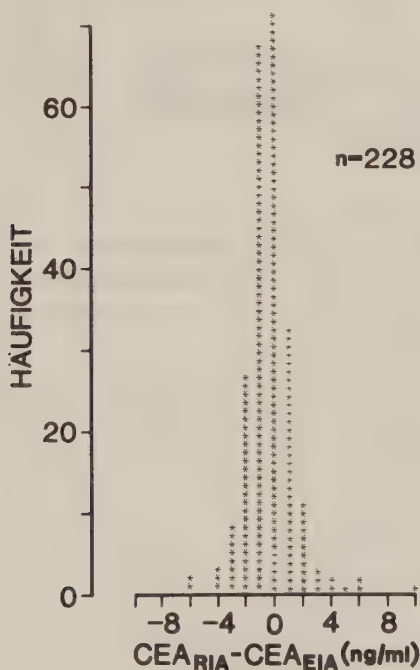


Abb. 14 : Gastrointestinale Karzinome:

Häufigkeitsverteilung der CEA-Konzentrationsdifferenzen identischer Proben nach radioimmunologischer und enzymimmunologischer Bestimmung

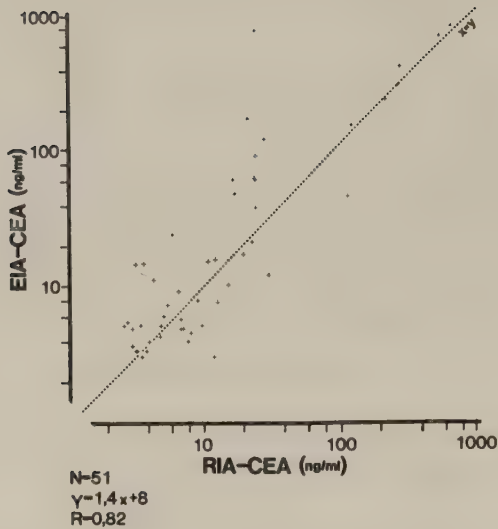


Abb. 15 : Gastrointestinale Karzinome:

Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-
Werten im Konzentrationsbereich über 2.5 ng/ml

Der Wilcoxon-Paardifferenzentest ergab einen signifikanten Unterschied beider Methoden ($p = 0.00$).

Bei Werten über der Referenzbereichsgrenze des RIA von über 2.5 ng/ml ($n = 51$) betrug der Korrelationskoeffizient 0.82, die Steigung der Ausgleichgeraden 1.4 und der Intercept 8 (Abb. 15).

Der Wilcoxon-Paardifferenzentest ergab einen signifikanten Unterschied beider Methoden ($p = 0.00$).

3.3.2.2.3. Kolon-Rektumkarzinome

Der Korrelationskoeffizient betrug bei Berücksichtigung der CEA-Werte unter 20 ng/ml ($n = 101$) 0.63, die Steigung der Ausgleichsgeraden lag bei 1.02 und der Intercept betrug 1.2 (Abb.16)

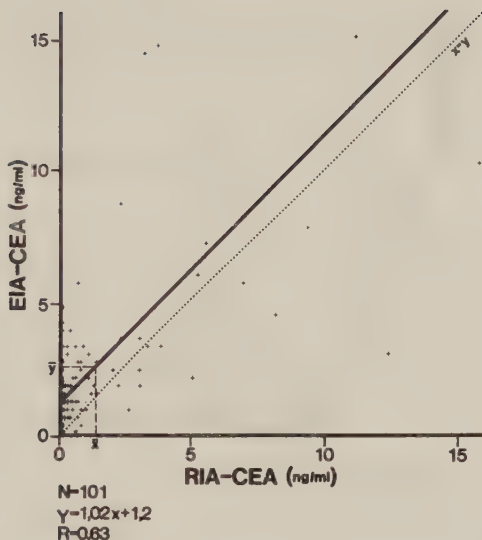


Abb. 16 : Kolon-Rektumkarzinome:

Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-
Werten im Konzentrationsbereich unter 20 ng/ml

Hier lagen die mit dem RIA erhaltenen Werte im Mittel um 1.2 ng/ml niedriger als die mit dem EIA gemessenen Werte (Abb. 17). Der Streubereich betrug -11 bis +9.3 .

5 Patienten mit klinisch gesicherten Karzinomen wiesen mit dem EIA im deutlich pathologischen Bereich liegende CEA-Konzentrationen auf, während mit dem RIA im Normalbereich liegende Werte ermittelt wurden.

Umgekehrt wurde in einem Serum mit dem RIA ein pathologischer Wert und mit dem EIA ein im Normalbereich liegender Wert gefunden.

Nach dem Wilcoxon-Paardifferenzentest bestand ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Methoden ($p = 0.00$).

Bei Werten über der Referenzbereichsgrenze des RIA von über 2.5 ng/ml ($n = 28$) betrug der Korrelationskoeffizient 0.8, die

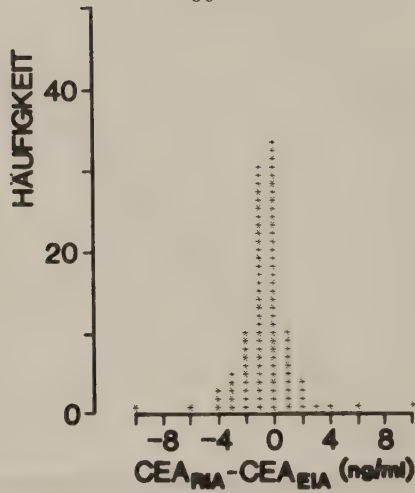


Abb. 17 : Kolon-Rektumkarzinome:
Häufigkeitsverteilung der CEA-Konzentrationsdifferenzen identischer Proben nach radioimmunologischer und enzymimmunologischer Bestimmung

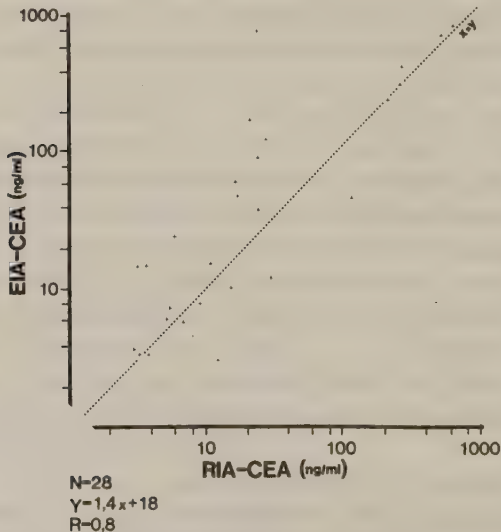


Abb. 18 : Kolon-Rektumkarzinome:
Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-Werten im Konzentrationsbereich über 2.5 ng/ml

Steigung der Ausgleichsgeraden 1,4 und der Intercept 18 (Abb.18). Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Methoden ($p = 0.006$).

3.3.2.2.4. Entzündliche Darmerkrankungen

Bei Berücksichtigung der im direkten Meßbereich beider Methoden (unter 20 ng/ml) liegenden CEA-Werte ($n = 35$) betrug der Korrelationskoeffizient 0,87, die Steigung der Hauptkomponentengeraden 0,6 und der Intercept 0,75 (Abb. 19).

Die mit dem RIA erhaltenen Werte lagen im Mittel um 0,16 ng/ml niedriger als die mit dem EIA gemessenen Werte (Abb. 20).

Der Streubereich betrug -3,2 bis +5,8.

Es bestand nach dem Wilcoxon-Paardifferenzentest ein signifi-

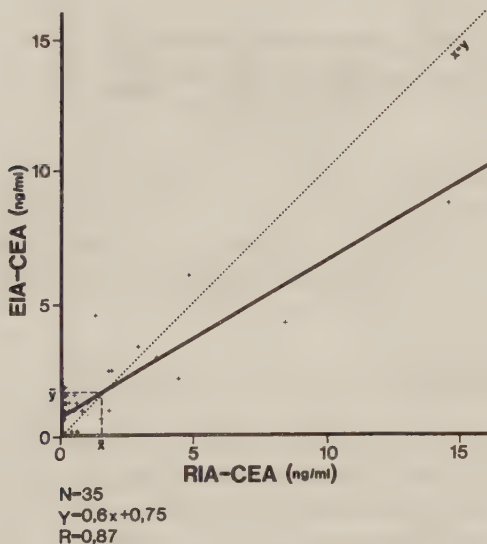


Abb. 19 : Entzündliche Darmerkrankungen
Vergleichsdarstellung von CEA-RIA-
und CEA-EIA-Werten

kanter Unterschied zwischen beiden Methoden ($p = 0.02$). In dieser Diagnosegruppe mit benignen Erkrankungen wurde in 5 Fällen mit beiden Methoden ein über den jeweiligen Referenzbereichsgrenzen liegender CEA-Wert ermittelt.

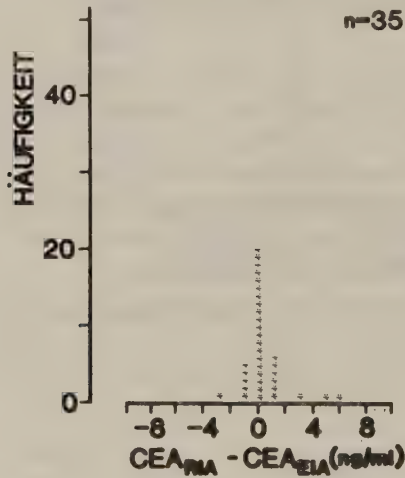


Abb. 20 : Entzündliche Darmerkrankungen:
Häufigkeitsverteilung der CEA-Konzentrationsdifferenzen identischer Proben nach radioimmunologischer und enzymimmunologischer Bestimmung

3.3.2.2.5. Darmpolypen

Beim Vergleich der RIA-Werte mit denen des EIA betrug der Korrelationskoeffizient 0.7 ($n = 10$), die Steigung der Ausgleichsgeraden 1.2 und der Intercept 1 (Abb. 21).

Die mit dem RIA gemessenen Werte lagen im Mittel um 1.12 ng/ml niedriger als die mit dem EIA gemessenen Werte.

Der Wilcoxon-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Methoden ($p = 0.004$).

In dieser benignen Diagnosegruppe wurde in einem Fall mit dem EIA ein über der Referenzbereichsgrenze liegender Wert (3.9 ng/ml) ermittelt, während der entsprechende RIA-Wert (1.3 ng/ml) im Referenzbereich lag.

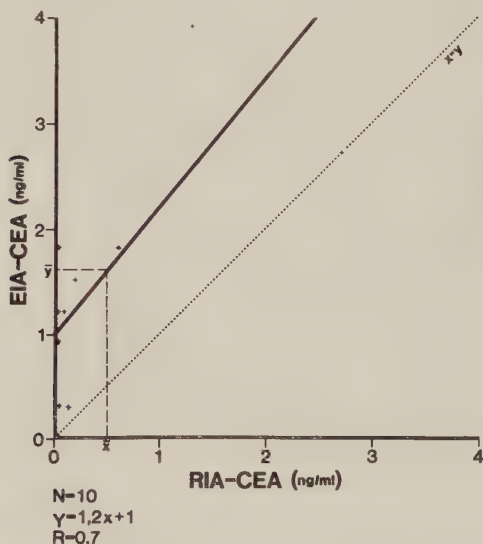


Abb. 21 : Darmpolypen:

Vergleichsdarstellung von CEA-RIA-
und CEA-EIA-Werten

3.3.2.2.6. Maligne abdominale Neubildung (nicht klassifiziert)

Die Korrelation zwischen CEA-RIA und CEA-EIA ($n = 26$) betrug hier 0.7, die Steigung der Ausgleichsgeraden 1.3 und der Intercept 0.7 (Abb. 22).

Die mit dem RIA gemessenen Werte lagen im Durchschnitt um 1.23 ng/ml niedriger als die entsprechenden EIA-Werte. Der Streubereich betrug -5.8 bis +2.6.

Nach Überprüfung mit dem Wilcoxon-Test bestand ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Methoden ($p = 0,00$).

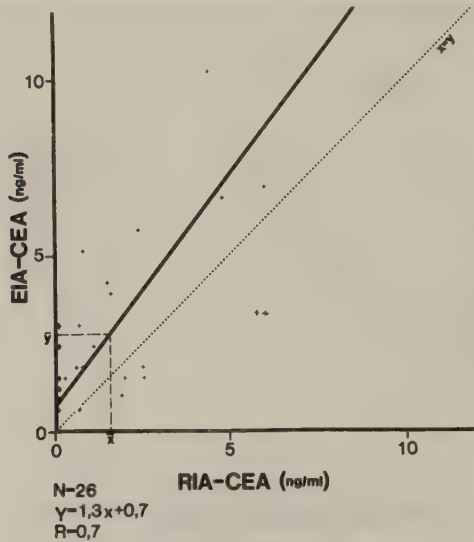


Abb. 22 : Maligne abdominale Neubildung (nicht klassifiziert):
Vergleichsdarstellung von CEA-RIA-
und CEA-EIA-Werten

3.3.2.2.7. Leberkarzinom

Im direkten Meßbereich beider Methoden (unter 20 ng/ml) ($n=28$) betrug der Korrelationskoeffizient 0.6, die Steigung der Ausgleichsgeraden 0.6 und der Intercept 1.4 (Abb. 23).

Im Mittel lagen die mit dem RIA gemessenen Werte um 0.57 ng/ml niedriger. Der Streubereich betrug -7.3 bis +8.

Nach dem Wilcoxon-Paardifferenzentest bestand kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Methoden ($p = 0,06$).

In 4 Fällen wurden mit dem EIA deutlich pathologische Werte

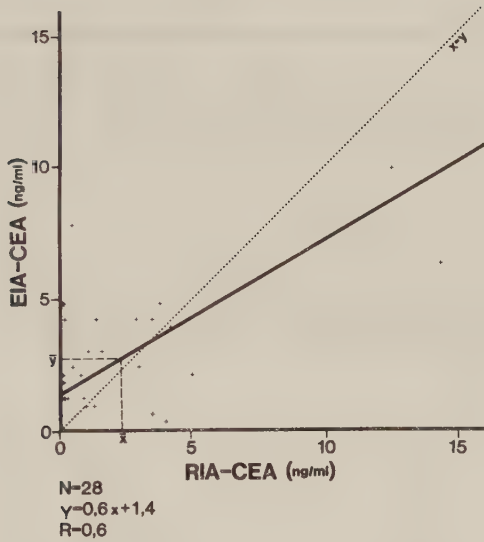


Abb. 23 : Leberkarzinom:

Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-
Werten im Konzentrationsbereich unter 20 ng/ml

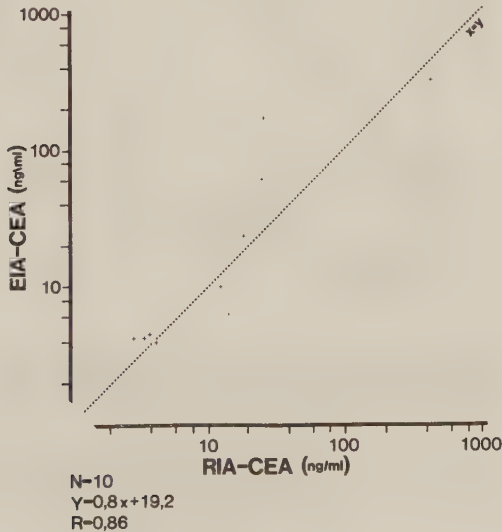


Abb. 24 : Leberkarzinom:

Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-
Werten im Konzentrationsbereich über 2.5 ng/ml

über 4 ng/ml gemessen, während die RIA-Werte im Normalbereich lagen.

Eine Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-Werten im Konzentrationsbereich über 2.5 ng/ml zeigt Abbildung 24.

3.3.2.2.8. Leberzirrhose

Im Meßbereich unter 20 ng/ml ($n = 18$) lag die Korrelation zwischen beiden Methoden bei 0.62, die Steigung der Ausgleichsgeraden betrug 1.4 und der Intercept -0.25 (Abb. 25).

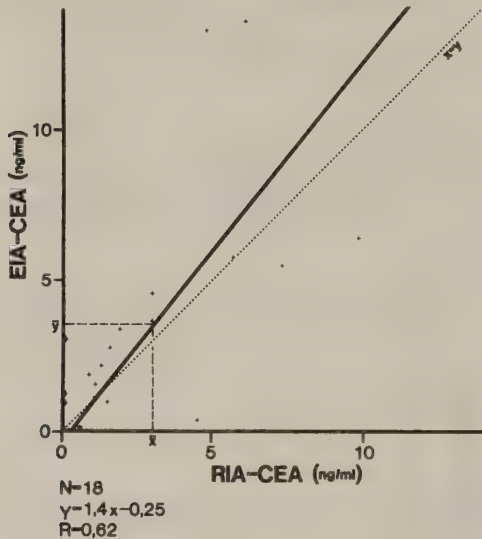


Abb. 25 : Leberzirrhose:

Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-Werten im Konzentrationsbereich unter 20 ng/ml

Im Mittel lagen die mit dem RIA gemessenen Werte um 0.92 ng/ml niedriger. Der Streubereich betrug -8.4 bis +4.2 .

Nach dem Wilcoxon-Test bestand kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Methoden ($p = 0.08$).

In 7 Fällen wurde bei dieser nicht-malignen Diagnosegruppe mit beiden Methoden ein z.T. deutlich über der jeweiligen Referenzbereichsgrenze liegender CEA-Wert ermittelt.

3.3.2.2.9. Gallenblasenkarzinom

Einen Vergleich der mit beiden Methoden gemessenen CEA-Werte zeigt Abbildung 26.

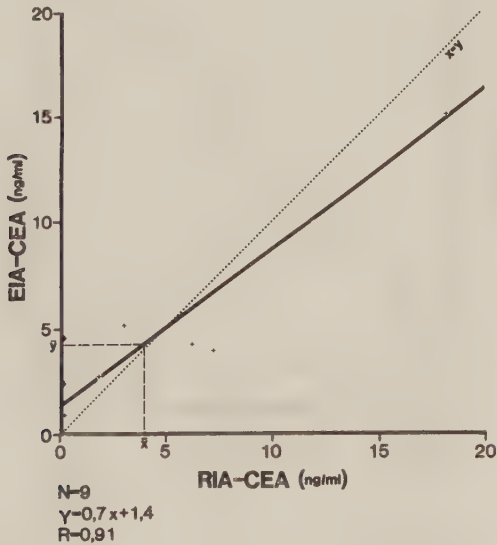


Abb. 26 : Gallenblasenkarzinom:

Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-Werten

Die mit dem RIA gemessenen Werte lagen im Durchschnitt um 0.92 ng/ml niedriger (Streubereich : -4.5 bis +3.3).

In einem Fall wurde mit dem EIA ein deutlich pathologischer

Wert gemessen, während der RIA-Wert im Normalbereich lag.

3.3.2.2.10. Pankreaskarzinom

Wurden nur die im direkten Meßbereich beider Methoden liegenden Werte unter 20 ng/ml ($n = 26$) berücksichtigt, so betrug der Korrelationskoeffizient 0.9, die Steigung der Ausgleichsgeraden 0.9 und der Intercept 1.5 (Abb. 27).

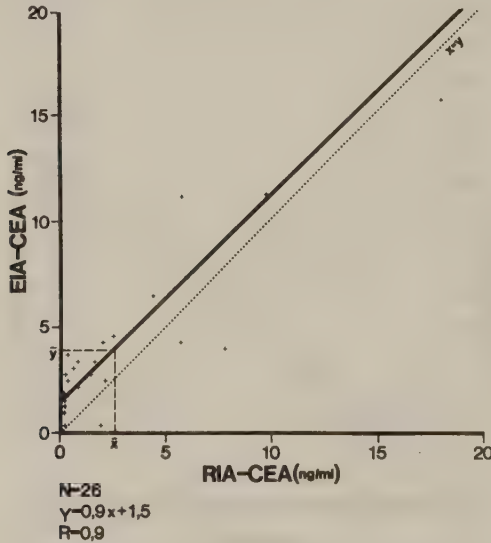


Abb. 27 : Pankreaskarzinom:

Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-
Werten im Konzentrationsbereich unter 20 ng/ml

Um 1.14 ng/ml lagen die mit dem RIA gemessenen Werte im Mittel niedriger als die entsprechenden EIA-Werte (Streubereich: -5.3 bis +3.9).

Bei einem Patienten wurde mit dem EIA ein deutlich pathologischer Wert (4.2 ng/ml) gemessen, während der entsprechende

RIA-Wert im Normalbereich (0.3 ng/ml) lag.

Nach Überprüfung mit dem Wilcoxon-Paardifferenzentest bestand ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Methoden ($p=0.00$).

3.3.2.2.11. Prostatakarzinom

Die Korrelation für die im direkten Meßbereich beider Methoden liegenden CEA-Werte unter 20 ng/ml ($n = 15$) betrug 0.3, der Intercept der Ausgleichsgeraden 1.7 und die Steigung 0.6 (Abb. 28).

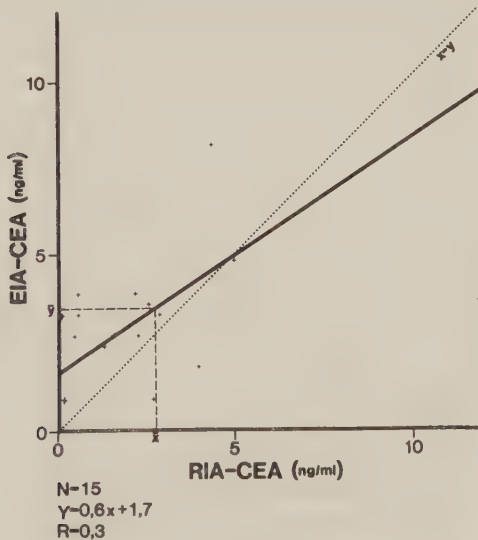


Abb. 28 : Prostatakarzinom:

Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-
Werten im Konzentrationsbereich unter 20 ng/ml

Die mit dem RIA gemessenen Werte lagen im Mittel um 0.54 ng/ml niedriger als die entsprechenden EIA-Werte (Streubereich: -3.7 bis +8.3).

In 2 Fällen wurden mit dem EIA deutlich pathologische Werte gemessen, während die entsprechenden RIA-Werte im Referenzbereich lagen.

Umgekehrt wurde in einem Fall mit dem RIA ein deutlich pathologischer Wert, dagegen mit dem EIA ein im Referenzbereich liegender Wert gefunden.

3.3.2.2.12. Gynäkologische Tumoren

Bei CEA-Werten unter 20 ng/ml ($n = 16$) betrug die Korrelation zwischen CEA-RIA und CEA-EIA 0,5, die Steigung der Ausgleichsgeraden 0,7 und der Intercept 0,9 (Abb. 29).

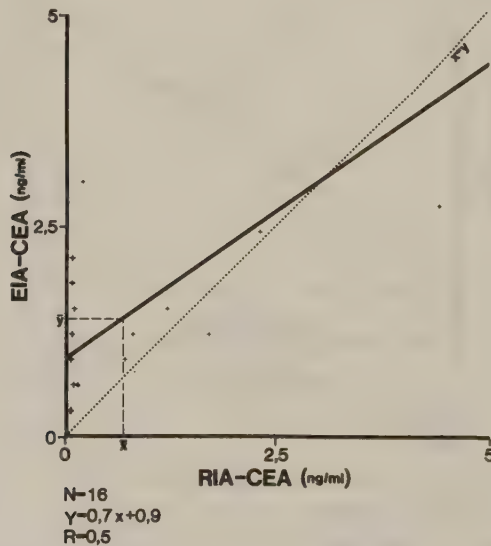


Abb. 29 : Gynäkologische Tumoren:

Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-Werten im Konzentrationsbereich unter 20 ng/ml

Im Mittel lagen die mit dem RIA gemessenen Werte um 0.68 ng/ml niedriger als die entsprechenden EIA-Werte (Streubereich : -2.8 bis +1.7).

3.3.2.2.13 Bronchialkarzinom

Im Konzentrationsbereich unter 20 ng/ml ($n = 19$) betrug der Korrelationskoeffizient zwischen RIA und EIA 0.8 , die Steigung der Hauptkomponentengeraden 1.7 und der Intercept 0.8 (Abb. 30).

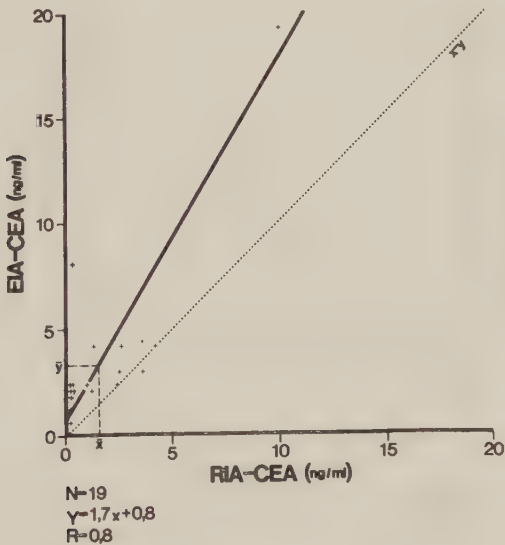


Abb. 30 : Bronchialkarzinom:
Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-
Werten im Konzentrationsbereich unter 20 ng/ml

Die RIA-Werte lagen im Mittel um 1.88 ng/ml niedriger als die entsprechenden EIA-Werte (Streubereich : -9.1 bis +0.6)

Ein Patient mit gesichertem Bronchialkarzinom wies mit dem EIA einen deutlich im pathologischen Bereich liegenden CEA-Wert auf, während mit dem RIA ein im Referenzbereich liegender Wert erhalten wurde.

Umgekehrt wurde kein allein mit dem RIA im pathologischen Bereich liegender Wert gefunden.

Im Wilcoxon-Paardifferenzentest ergab sich ein signifikanter Unterschied beider Methoden ($p = 0,00$).

Bei Werten über der Referenzbereichsgrenze des RIA von über 2.5 ng/ml ($n = 12$) betrug der Korrelationskoeffizient 0.3, die Steigung der Ausgleichsgeraden 0.6 und der Intercept 11 (Abb.31).

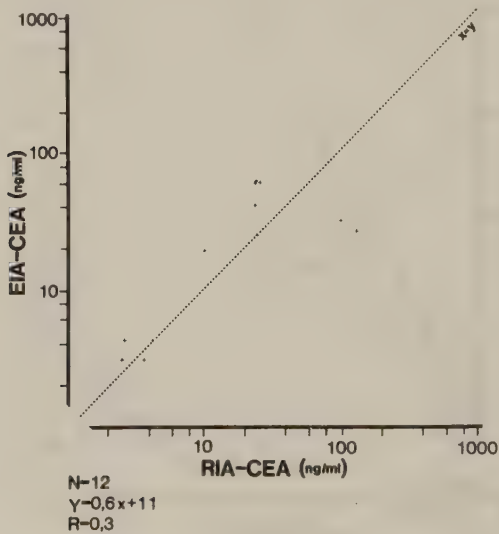


Abb. 31 :Bronchialkarzinom:

Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-
Werten im Konzentrationsbereich über 2.5 ng/ml

3.3.2.2.14. Klinisch gesicherte maligne Tumoren
(nicht klassifiziert)

In dieser heterogen zusammengesetzten Diagnosegruppe (u.a. Schilddrüsenkarzinom, Lymphosarkom, Teratom, Basaliom und cerebrale Tumoren) betrug bei Berücksichtigung nur der im Bereich unter 20 ng/ml liegenden CEA-Werte ($n = 24$) die Korrelation zwischen RIA und EIA 0.74, die Steigung der Ausgleichsgeraden 0.8 und der Intercept 1 (Abb. 32).

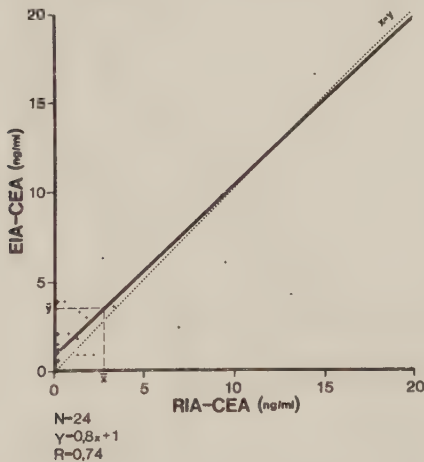


Abb. 32 : Klinisch gesicherte maligne Tumoren (nicht klass.)
Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-
Werten im Konzentrationsbereich unter 20 ng/ml

Im Mittel lagen die mit dem RIA gemessenen Werte um 0.44 ng/ml niedriger als die mit dem EIA erhaltenen Werte (Streubereich: -3.9 bis +8.9).

3.3.2.2.15. Verdacht auf maligne Neubildung

Entsprechend der vorher beschriebenen, sehr heterogen zusammengesetzten Diagnosegruppe wurden hier Patienten, bei denen sich allein aufgrund klinischer Untersuchungen der Verdacht auf das Vorliegen einer malignen Erkrankung ergab, zur statistischen Auswertung zusammengefaßt.

Im direkten Meßbereich beider Methoden unter 20 ng/ml ($n = 87$) betrug der Korrelationskoeffizient zwischen RIA- und EIA-Werten 0,48, die Steigung der standardisierten Hauptkomponentengeraden betrug 1,2 und der Intercept 0,9 (Abb. 33).

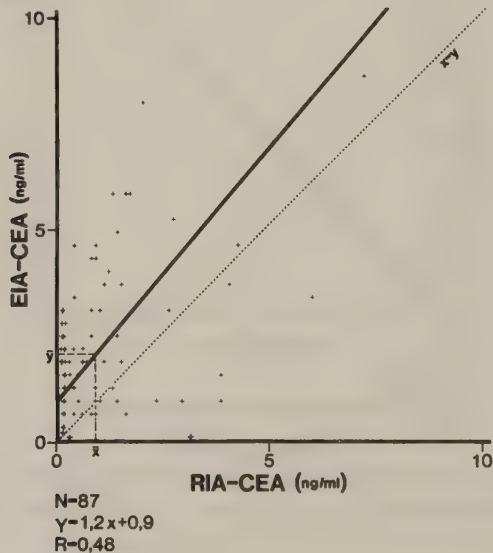


Abb. 33 : Verdacht auf maligne Neubildung:

Vergleichsdarstellung von CEA-RIA- und CEA-EIA-
Werten im Konzentrationsbereich unter 20 ng/ml

Die mit dem RIA gemessenen Werte lagen im Mittel um 1,12 ng/ml niedriger als die entsprechenden mit dem EIA gemessenen Werte

(Streubereich : -5.8 bis +3.1).

Die Häufigkeitsverteilung der CEA-Konzentrationsdifferenzen ist in Abbildung 34 dargestellt.

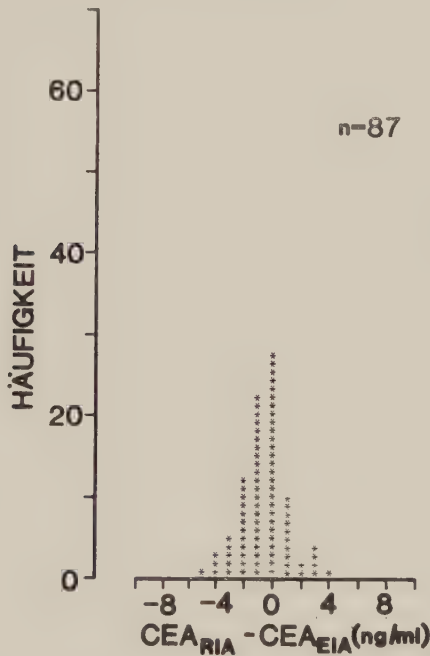


Abb. 34 : Verdacht auf maligne Neubildung:
Häufigkeitsverteilung der CEA-Konzentrationsdifferenzen identischer Proben nach radioimmunologischer und enzymimmunologischer Bestimmung

In 10 Fällen wurden mit dem EIA deutlich pathologische Werte über 4 ng CEA/ml gemessen, während mit dem RIA im Referenzbereich liegende Werte ermittelt wurden. Umgekehrt wurde nur in 2 Seren mit dem RIA ein deutlich pathologischer Wert und mit dem EIA ein im Referenzbereich liegender Wert gefunden. Der Wilcoxon-Test ergab einen signifikanten Unterschied beider Methoden ($p = 0.00$).

4. DISKUSSION

4.1. Diskussion der methodischen Ergebnisse

4.1.1. Nachweisgrenze und Messbereich

Aufgrund unserer Untersuchungen lag die untere Nachweisgrenze des CEA-EIA bei 0.5 ng/ml .MAIOLINI (72) gibt für den gleichen Enzymimmunoassay einen Wert von 0.25 ng/ml an.Für einen ähnlich aufgebauten Enzymimmunoassay nennen FRACKELTON et al.(34) mit 0.2 ng/ml einen vergleichbaren Wert.

Für den Radioimmunoassay liegt die untere Nachweisgrenze nach CHU und REYNOSO (16) bei 0.5 ng/ml.Der gleiche Wert wird auch für den Thompson-Ammoniumsulfat-RIA angegeben (30) .

Somit weisen sowohl der RIA als auch der EIA hinsichtlich der Nachweisgrenzen gute und vergleichbare Ergebnisse auf.

Bezüglich des Meßbereiches ergeben sich zwischen den beiden Analysenverfahren jedoch deutliche Unterschiede:

Die obere Grenze der Standardkurve liegt für den Enzymimmunoassay bei 20 ng/ml;da die Proben jedoch im Extraktionsschritt 3-fach verdünnt werden,reicht der Meßbereich hier von 0.5 bis 60 ng/ml .Der überwiegende Anteil der zur CEA-Konzentrationsmessung anfallenden Proben liegt innerhalb dieses Meßbereiches. Proben mit CEA-Konzentrationen über 60 ng/ml werden mit entsprechender Menge Null-Standard verdünnt und erneut nach der gleichen Methode wie die im direkten Meßbereich liegenden Proben gemessen.

Der direkte Meßbereich des Radioimmunoassayserstreckt sich lediglich bis 20 ng/ml.Beim Überschreiten dieser Grenze müssen Plasmaproben mit dem direkten Verfahren ohne Perchlorsäureextraktion erneut bestimmt werden.

Hier weist somit der EIA dem RIA gegenüber (in Abhängigkeit vom Patientenkollektiv) eindeutige Vorteile auf.

4.1.2. Präzision

Die Präzisionskontrolluntersuchungen des EIA ergaben in dieser Untersuchung für die Intraassay-Varianz je nach CEA-Konzentration Variationskoeffizienten zwischen 4.3 und 6.9 % (Tab. 3). Entsprechend lagen die Werte für die Interassay-Varianz des EIA zwischen 6.4 und 21.8 % (Tab. 4).

Ähnliche Ergebnisse werden von WINTZER (117) und MAIOLINI (72) angegeben.

Für den Z-Gel-CEA-Radioimmunoassay fanden wir nach eigenen Untersuchungen (83) bei einer mittleren Konzentration von 2.8 ng/ml in der Intraassay-Varianz einen Variationskoeffizienten von 16.4 % .Die Interassay-Varianz betrug bei einer Konzentration von 1.9 ng/ml 26.5 % .Von MARTIN et al.(75) wird ein Variationskoeffizient von 8.95 bis 19.35 % für die Intraassay-Varianz und von 9.91 bis 13.05 % für die Präzision von Tag zu Tag angegeben.ONIZAWA et al.(88) hat für den RIA Variationskoeffizienten von 12 bis 25 % für die Intraassay-Varianz erhalten und HRAI (52) schließlich gibt für die Interassay-Varianz des RIA Werte von 9.2 bis 17.9 % an.

Somit zeichnet sich der Enzymimmunoassay durch gute und gegenüber dem RIA bessere Ergebnisse der Präzisionskontrollversuche aus.

Insbesondere im klinisch wichtigen CEA-Konzentrationsbereich lagen für den EIA die Variationskoeffizienten jeweils unter 9 %.

Der Grund für die vergleichsweise schlechtere Präzision des RIA dürfte in dem mit vielen Fehlerquellen behafteten Dialyseschritt liegen (s.u.).

4.1.3. Methodenvergleich

4.1.3.1. Diskussion der differenten Untersuchungsergebnisse

In dieser Untersuchung wurden zwei Methoden zur Bestimmung der CEA-Konzentration im Blut anhand von 1010 Seren verglichen.

Dabei wurde die Korrelation der Meßergebnisse des RIA und des EIA sowohl für den direkten Meßbereich beider Methoden (CEA-Konzentrationen unter 20 ng/ml) als auch für den klinisch relevanten Bereich (CEA-Konzentrationen über 2.5 ng/ml) überprüft.

In Abb. 3 ist die Korrelation zwischen RIA und EIA für den Bereich unter 20 ng / ml dargestellt. Es besteht hier eine mäßig gute Übereinstimmung mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0.72$.

Die Ausgleichsgerade der standardisierten Hauptkomponente verläuft mit einer Steigung von 1.02 als Maß für analysenspezifische, proportionale Fehler der Winkelhalbierenden nahezu parallel. Der Intercept der Ausgleichsgeraden als Maß für analysenspezifische, konstante Fehler liegt bei 0.87.

Eine Bewertung des Ergebnisses anhand der Ausgleichsgeraden ist jedoch wegen der nicht sehr guten Korrelation und der überwiegend im unteren Meßbereich, der bei beiden Methoden mit einem relativ großen Meßfehler behaftet ist, liegenden CEA-Werte problematisch.

Wie die Abbildung zeigt, ist die Abweichung der mit dem RIA und dem EIA erzielten Meßwerte identischer Proben zum Teil erheblich.

In 191 Proben wurden mit dem EIA deutlich pathologische Werte mit über 5 ng / ml gefunden, während die entsprechenden RIA-Werte im Referenzbereich lagen. Umgekehrt ergaben lediglich 11 Serumproben mit dem RIA pathologische CEA-Konzentrationen, mit dem EIA dagegen im Referenzbereich liegende Werte.

Die höhere Rate an mit dem Enzymimmunoassay gemessenen CEA-Werten über 2.5 ng/ml könnte ein Hinweis sein auf eine verbesserte diagnostische Empfindlichkeit und Spezifität dieser Bestimmungsmethode gegenüber dem Radioimmunoassay. Diese Frage wird weiter unten diskutiert.

Ein weiterer Grund für die mit dem EIA gemessenen, im Mittel um 1 ng/ml höher liegenden CEA-Konzentrationen, kann in der bei dem Enzymimmunoassay entfallenden PCA-Extraktion liegen (s.u.).

Werden nur die klinisch relevanten CEA-Werte über 2.5 ng/ml verglichen (Abb. 4), so ist die Korrelation zwischen RIA und EIA mit $r = 0.61$ schlechter.

Die Steigung der Hauptkomponentengeraden liegt hier bei 0.81, der Intercept beträgt 3.17 .

Auch hier zeigen sich teilweise erhebliche Differenzen zwischen den mit beiden Methoden gemessenen CEA-Werten identischer Proben. Besonders bei Werten über 20 ng/ml besteht zwischen RIA und EIA wenig Übereinstimmung.

Für klinische Fragestellungen ist dies kein sehr großer Nachteil, da Konzentrationsunterschiede in diesem Bereich von begrenzter klinischer Aussage sind.

Die von anderen Arbeitsgruppen beschriebenen, deutlich besseren Korrelationen zwischen dem Abbott-EIA und dem Roche-RIA konnten in dieser Untersuchung nicht bestätigt werden:

So geben OEHR et al. (86) bei einem Vergleich der Ergebnisse der beiden Analysenverfahren einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0.89$ an. Von WINTZER et al. (117) wird bei einem Vergleich der gemessenen CEA-Konzentrationen von 150 Seren ein Korrelationskoeffizient von $r = 0.91$ angegeben.

Zu berücksichtigen ist, daß bei beiden oben genannten Untersuchungen die Fallzahlen mit 71 bzw. 150 untersuchten Proben deutlich niedriger lagen als in der vorliegenden Studie.

Weiterhin muß darauf hingewiesen werden, daß die Präzisionskontrollversuche des EIA in unserer Untersuchung Ergebnisse erbracht haben, die mit den Ergebnissen dieser Autoren vergleichbar sind, so daß methodische Fehler, etwa durch eine schlechte Präzision bedingt, als Ursache für die teilweise niedrigeren Korrelationskoeffizienten weitgehend ausgeschlossen werden können.

Schließlich muß darauf hingewiesen werden, daß das in allen Untersuchungen zum Methodenvergleich verwendete statistische Verfahren der linearen Regression durch die nicht-parametrische Verteilung der CEA-Konzentrationen erheblich beeinflußt wird.

Im folgenden sollen die unterschiedlichen Meßergebnisse der

CEA-Konzentrationen identischer Proben, die auf immunologische und methodische Differenzen zurückzuführen sein dürften, diskutiert werden:

4.1.3.1.1. Immunologische Differenzen

Wenn die Meßergebnisse verschiedener Immunoassays vergleichbar sein sollen, so müßte vorausgesetzt werden, daß die bei den verschiedenen Analysensystemen zur Anwendung kommenden Antigene bzw. Standardpräparationen absolut identisch sind. Zur Zeit gibt es noch keinen international anerkannten CEA-Standard.

Infolge fehlender Standardisierung unterscheiden sich die Methoden der CEA-Extraktion und -Reinigung der einzelnen Arbeitsgruppen erheblich (Perchlorsäureextraktion bzw. Herstellung einfacher saliner Extrakte).

Neben physikochemischen Unterschieden zeigen diese CEA-Präparationen eine ausgeprägte Heterogenität der Antigen-Determinanten (97).

Von verschiedenen Autoren wird auf die Heterogenität der Standardpräparationen in unterschiedlichen Immunoassays zur Bestimmung von CEA im Blut hingewiesen:

VRBA et al. (114) haben in einem Radioimmunoassay die CEA-Standardpräparationen von 4 verschiedenen kommerziell erhältlichen Radioimmunoassay-Kits zur Bestimmung von CEA im Blut verglichen und dabei herausgefunden, daß die mit dem CEA-Roche-Standard erhaltene Bezugskurve einen völlig anderen Verlauf aufweist als die mit den anderen drei Standards gebildeten Bezugskurven.

Auch WAGENER et al. (115, 116) haben bei einem Vergleich der Standards des Roche-CEA-RIA und des CEA-IRE-SORIN (CIS)-Assay-Kits bei der Aufstellung der Standardkurven in Bezug auf vergleichbare Hemmungen quantitative Unterschiede festgestellt: So wurde bei dieser Untersuchung deutlich mehr CEA-CIS als CEA-Roche benötigt, um gleiche Hemmungen im CEA-Radioimmunoassay zu erhalten. Dies führte bei Verwendung von CIS-Standard zu höheren

gemessenen CEA-Konzentrationen im Plasma.

Diese Ergebnisse werden auch von ASHMAN et al. (2) bestätigt. Neben den von VRBA et al. (114) beschriebenen qualitativen Differenzen werden von anderen Autoren quantitative Differenzen zwischen den Standardpräparationen für die unterschiedlichen RIA-Meßergebnisse verantwortlich gemacht:

NEWMAN et al. (84) sehen als Ursache für unterschiedliche quantitative Immunoreaktivität einen differierenden Wassergehalt der jeweiligen Standardpräparationen nach deren Lyophilisation an.

Weiterhin kann Autolyse die Präparationen unterschiedlich beeinflussen, besonders wenn eine Ionenaustauschchromatographie bei der Isolierung unterlassen wurde.

PERSIJN und KORSTEN (91) betonen die Wichtigkeit einer ausgeprägten Dialyse der CEA-Präparationen nach deren Lösung in Phosphatpuffer zur vollständigen Entfernung von Natriumsalzen. Eine unvollständige Entfernung führt zu quantitativen Differenzen in den Standardpräparationen.

Folge der Heterogenität der Antigen-Präparationen sind zwangsläufig Unterschiede im Bindungscharakter der verwendeten Antiseren. Dies hat ebenfalls erheblichen Einfluß auf das Meßergebnis:

So berichten VRBA et al. (114) und WAGENER et al. (115) von unterschiedlichen Meßergebnissen der radioimmunologischen CEA-Bestimmung je nach verwendetem Antiserum.

Verantwortlich für diese Differenzen scheinen auch verschiedene Methoden bei der Herstellung der Antiseren zu sein. Insbesondere die Immunisierung der Tiere und die jeweils angewandten Adsorptionsmethoden sind hier zu nennen:

Die Adsorption der Antisera erfolgt an normales Human-Plasma, an saline- bzw. PCA-Extrakte der Mukosa des Verdauungstraktes oder an rote Blutzellen der Blutgruppen A und B. Weiterhin werden für die Immunisierung verschiedene Tierspezies verwandt. Die differierenden Ergebnisse können damit erklärt werden, daß die jeweils verwendeten Antiseren aus Antikörper-Populationen mit unterschiedlicher Affinität zu den verschiedenen Antigen-

Determinanten der CEA-Präparationen bestehen.

Somit sind unter Berücksichtigung dieser aus der Literatur zitierten Befunde für die in der vorliegenden Untersuchung zwischen den Meßergebnissen des Roche-RIA und des Abbott-EIA aufgetretenen Differenzen mit größter Wahrscheinlichkeit die verschiedenen CEA-Standardpräparationen sowie die jeweils verwendeten Antiseren mit ihrer unterschiedlichen Bindungscharakteristik verantwortlich.

Ein international anerkannter CEA-Standard ist Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der mit verschiedenen Analysemethoden bestimmten CEA-Konzentrationen im Blut. Dies ist in diesem Fall um so wichtiger, da es sich bei dem CEA um eine "Familie von Isoantigenen" mit vielfachen antigenetischen Determinanten handelt.

4.1.3.1.2. Methodische Differenzen

Eine weitere mögliche Ursache der teilweise unzulänglichen Korrelation zwischen dem RIA und dem EIA ist in unterschiedlichen methodischen Prinzipien der beiden Assaysysteme zu suchen:

Bei dem RIA handelt es sich um eine kompetitive Testmethode mit PCA-Extraktion, gefolgt von einer Z-Gel-Trennung.

Der EIA arbeitet mit der nicht-kompetitiven solid-phase Sandwich Technik nach Hitzedenaturierung.

Über den Einfluß der PCA-Extraktion gibt es verschiedene Stellungnahmen: WAGENFELDER (116) und andere Autoren (97, 28, 103) haben in Untersuchungen festgestellt, daß nach PCA-Extraktion des Plasmas die CEA-Konzentrationen, verglichen mit den Werten eines direkt durchgeführten Assays, signifikant niedriger lagen. Ursachen könnten ein CEA-Verlust durch die Extraktion sein oder das Vorhandensein von im Plasma vorkommenden Proteinen, welche in PCA unlöslich sind, die jedoch mit CEA gemeinsame Antigen-Merkmale besitzen.

In Einzelfällen wurden mit dem direkten Assay extrem hohe CEA-Werte gemessen, während mit dem indirekten Assay nach PCA-Ex-

traktion CEA in derselben Probe nicht nachweisbar war (116). Somit könnte die bei der EIA-Methode entfallende Perchlorsäureextraktion für die bei dem Enzymimmunoassay durchschnittlich höher liegenden Meßwerte verantwortlich sein.

Schließlich führt die Dialyse, die im RIA wegen der PCA-Extraktion notwendig ist, zu weiteren Problemen und Fehlerquellen:

Die Wasserqualität und insbesondere der pH müssen gleichbleibend konstant sein. Weiterhin muß jede Probe in einen Dialyseschlauch und anschließend wieder in ein Probengefäß transferiert werden. Dabei sind, von Assistentin zu Assistentin unterschiedliche Probenverluste unvermeidbar.

Außerdem können durch defekte Dialyseschläuche Fehlbestimmungen entstehen.

PERSIJN et al. (91) nennen als Ursache für die mit dem indirekten RIA gemessenen CEA-Werte, die um 15 % niedriger lagen als die nach einer direkten Methode gemessenen Werte, eine endosmotische Volumenzunahme der Probe während der Dialyse.

Diese unterschiedlichen immunologischen Charakteristika und die methodischen Differenzen zeigen die Problematik eines Vergleichs der mit dem RIA und dem EIA gemessenen CEA-Konzentrationen im Blut.

Es muß daraus gefolgert werden, daß für einen individuellen Patienten zur Therapie- und Verlaufskontrolle maligner Tumoren aus Gründen der Vergleichbarkeit nur eine von beiden Methoden verwendet werden darf, um fehlerhafte Schlußfolgerungen zu vermeiden.

4.1.3.2. Praktikabilität

Neben dem Methodenvergleich anhand der erhaltenen Meßergebnisse müssen jedoch auch Vergleiche bezüglich der Praktikabilität der beiden Assaysysteme angestellt werden:

Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Analysenverfahren Radioimmunoassay bzw. Enzymimmunoassay ist durch die

unterschiedliche Markierung des Antigens gegeben.
Das Charakteristikum des EIA ist der fehlende Umgang mit radioaktiven Substanzen. In diesem Zusammenhang ergeben sich folgende Vorteile für den Enzymimmunoassay:

1. Mit dem EIA entfällt die gesundheitliche Gefährdung durch ionisierende Strahlen.
2. Die Haltbarkeit der Reagenzien ist beim EIA deutlich länger. Während die radioaktiv markierten Testsubstanzen des RIA wegen der Radiolyse und der relativ kurzen physikalischen Halbwertszeit des J^{125} nur wenige Tage bis Wochen haltbar sind, sind die Reagenzien des EIA bis zu 1/2 Jahr zu verwenden.
3. Die immer problematischer werdende Abfallbeseitigung radioaktiver Substanzen, die bei dem EIA entfällt.
4. Geringerer apparativer Aufwand.
Während mit dem RIA im letzten Reaktionsschritt eine Scintillationsmessung durchgeführt werden muß, erfolgt bei dem EIA eine einfache photometrische Messung nach einer enzymatischen Reaktion.
Neben einem (teuren) Gammazähler müssen zur Durchführung des RIA Räumlichkeiten vorhanden sein, die den Strahlenschutzbestimmungen entsprechen.
Dagegen wird zur Durchführung des EIA im wesentlichen lediglich eine Absaugvorrichtung zum Waschen der beschichteten Kugeln und ein in den meisten Laboratorien ohnehin vorhandenes Spektralphotometer benötigt.

Aber auch bei den einzelnen Arbeitsschritten bietet der EIA wichtige Vorteile:

Bei dem EIA entfällt der zur Durchführung des RIA notwendige Dialyseschritt.

Dieser Arbeitsgang ist, wie oben beschrieben, sehr aufwendig und kann leicht zu Fehlbestimmungen führen. Weiterhin erfordert dieser sehr zeitaufwendige Analysenschritt große Mengen entionisierten Wassers von hoher Qualität.

Er ist für die deutlich längere Analysenzeit des RIA verantwortlich:

Während die reine Arbeitszeit für die Bestimmung der CEA-Konzentration im Blut mit dem EIA für 40 Patientenserum in Doppelbestimmung 6 bis 8 Stunden beträgt und eine Befundübermittlung innerhalb eines Tages möglich ist, ist bei Anwendung des RIA eine Befundausgabe erst nach 2 Tagen möglich.

Bei nächtlicher Dialyse beträgt die reine Arbeitszeit mit dem RIA für 37 Doppelbestimmungen 8 bis 10 Stunden.

Ein weiterer Vorteil des EIA liegt in seinem größeren Meßbereich, der von 0.5 bis 60 ng/ml reicht.

Damit wird der größte Teil der in der täglichen Routine anfallenden Proben erfaßt. Proben mit einem CEA-Gehalt über 60 ng/ml werden mit Nullstandard verdünnt und durchlaufen anschließend erneut das gleiche Analysenverfahren.

Im Gegensatz dazu müssen bei Anwendung des RIA bereits Proben mit einer CEA-Konzentration von über 20 ng/ml erneut und nach der direkten Methode bestimmt werden.

Die quantitative Auswertung der Meßergebnisse ist für beide Assays rechnerunterstützt möglich:

Für den RIA können die CEA-Konzentrationen der Proben mit einem Tischrechner nach dem von RODBARD entwickelten Verfahren der linearen Regression nach Logit-Log-Transformation berechnet werden (96).

Zur Auswertung des EIA kann ein kommerziell erhältlicher Kleinrechner (Fa. Abbott) mit vollautomatischer Bewertung der photometrischen Meßergebnisse, unter Berechnung der Extinktionsdifferenzen (ΔE) sowie der CEA-Konzentrationen in ng/ml anhand der entsprechenden Standardkurve, herangezogen werden.

Ein für zentralisierte Institute nicht unerheblicher Vorteil des EIA für die CEA-Bestimmung in der Routine besteht darin, daß sowohl Plasma als auch Serum verwendet werden kann, während im CEA-RIA ausschließlich speziell abgenommene Plasma-Proben eingesetzt werden dürfen.

Bezüglich der Praktikabilität kann somit zusammenfassend gesagt

werden, daß der CEA-Enzymimmunoassay -bei besserer Präzision- gegenüber dem Radioimmunoassay die eindeutig methodisch einfachere, unproblematischere und zeitlich schneller durchzuführende Methode ist.

4.2. Diskussion der klinischen Ergebnisse

4.2.1. Referenzbereich

Von den meisten Autoren wird sowohl für die RIA-Methode nach GOLD (111,78,61) als auch für die HANSEN-Methode (70,95) übereinstimmend eine obere Referenzbereichsgrenze der CEA-Konzentration im Blut von 2.5 ng/ml angegeben.

Lediglich für die Doppelantikörpermethode nach TODD (28,66) reicht der Referenzbereich bis zu 12.5 ng / ml .Diese Abweichung dürfte methodisch bedingt sein.

Nach einer Untersuchung von HANSEN et al. (49) waren unter 1425 Personen eines Referenzbereichskollektives bei 88.5 % im Plasma CEA-Werte unter 2.6 ng/ml zu messen. Lediglich bei 10,2% dieser Personen lagen die CEA-Konzentrationen zwischen 2.6 und 5.0 ng/ml, bei 1.3 % wurden CEA-Werte über 5.0 ng/ml gemessen.

Bei der enzymimmunologischen CEA-Bestimmung im Blut von 144 klinisch und laborchemisch gesunden Erwachsenen lagen in der vorliegenden Studie 93 % der gemessenen Werte unter 2.5 ng/ml, 6.5 % der untersuchten Seren lagen zwischen 2.5 und 3.6 ng/ml und nur einer unserer Probanden wies einen Wert von 4.3 ng/ml auf.

Der Median lag bei 0.9 ng/ml.

Somit lagen die in dieser Untersuchung erhaltenen Ergebnisse bezüglich des Referenzbereiches in einem Größenbereich, der sich trotz der diskutierten methodischen Unterschiede nicht von

den Angaben der meisten anderen Autoren für die radioimmunologische CEA-Bestimmung, einschließlich des Roche-RIA, unterscheidet.

Vergleichbare Befunde für den hier untersuchten EIA wurden von MAIOLINI et al. (72) mitgeteilt:

In dieser Untersuchung lagen die CEA-Werte bei 87 % der untersuchten Kontrollgruppe unter 2.5 ng/ml, der Median lag bei 1.26 ng/ml.

Eine Prüfung auf Abhängigkeiten des untersuchten Kollektives (Geschlecht, Alter, Rauchgewohnheiten) wurde in dieser Studie nicht vorgenommen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß nach Arbeiten von HANSEN et al. (49) bei bestimmten Personen-Gruppen die Rate der falsch-positiven Befunde deutlich höher liegen kann:

Unter 620 Rauchern wiesen 93 Personen CEA-Werte über 2.5 ng/ml auf, 19 über 5.1 ng/ml und bei 6 Personen aus dieser Gruppe lag die CEA-Konzentration sogar über 10 ng/ml.

Weiterhin muß berücksichtigt werden, daß auch bei nicht-malignen Erkrankungen die Referenzbereichsgrenze von 2.5 ng/ml häufig überschritten wird. Hier sind insbesondere zu nennen: das Lungenemphysem, die (alkoholische) Leberzirrhose, Darmpolypen sowie entzündliche Magen-Darm-Erkrankungen (49).

Auch bezüglich der Altersgruppen hat HANSEN eine unterschiedliche Verteilung der Werte gefunden:

Der höchste Prozentsatz von über 2.5 ng/ml erhöhten CEA-Werten lag mit über 20 % bei Personen im Alter von 41 bis 60 Jahren, die niedrigsten CEA-Konzentrationen wurden bei Personen im Alter unter 20 Jahren gefunden (95 % unter 2.5 ng/ml).

In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, daß die Prävalenz von malignen Erkrankungen in der Altersgruppe von 40 bis 60 Jahren am höchsten ist.

Im Rahmen der diagnostischen Wertigkeit der CEA-Bestimmung muß aber auch eine relativ hohe Rate falsch-negativer Meßergebnisse berücksichtigt werden:

Selbst in einer Patientengruppe mit gesichertem entodermalen Karzinom wiesen 27 % der untersuchten Personen CEA-Werte unter

2.5 ng/ml auf. Bei Patienten mit Karzinomen nicht-entodermalen Ursprungs lag dieser Prozentsatz der falsch-negativen Ergebnisse sogar bei 52 % (49).

Dies zeigt die Probleme besonders der Beurteilung nur mäßig erhöhter CEA-Werte.

Eine genaue Berücksichtigung anderer Befunde (sowohl klinischer als auch klinisch-chemischer Befunde), die insbesondere auf entzündliche Erkrankungen hinweisen, ist in jedem Einzelfall unumgänglich.

4.2.2. Vergleich der mit beiden Methoden gemessenen CEA-Konzentrationen unter Berücksichtigung der Diagnose

Zur Abklärung, ob die wegen der oben beschriebenen Unterschiede in den Standardpräparationen und Antisera aufgetretenen Differenzen der CEA-RIA- und der CEA-EIA-Werte identischer Proben mit der Art der Erkrankung des Patienten korrelieren, wurden die CEA-Wertepaare für 15 Diagnosegruppen getrennt ausgewertet.

Die Auswertung erfolgte sowohl für die im direkten Meßbereich beider Methoden liegenden CEA-Werte im Bereich zwischen 0 und 20 ng/ml (Tab. 5), als auch - bei ausreichender Fallzahl - für alle klinisch relevanten Werte zwischen 2.5 und 1000 ng/ml (Tab. 6).

Die berechneten Daten für die einzelnen Diagnosegruppen (Korrelationskoeffizient, Steigung und Intercept der Ausgleichsgeraden sowie der Mittelwert der Konzentrationsdifferenzen RIA - EIA) sind in diesen Tabellen noch einmal zusammenfassend aufgeführt.

	DIAGNOSE	n	r	AUSGL.GERADE	p	RIA-EIA
1a	Mamma-Ca	74	0.78	$y = 1.4 x + 0.57$	0.00	-1.43
1b	Mamma-Ca Tumorst. 2/3	55	0.89	$y = 1.19x + 0.68$	0.00	-1.17
1c	Mamma-Ca Tumorst. 4	19	0.73	$y = 1.8 x + 0.2$	0.00	-2.5
2	Gastrointest. Tumoren	228	0.68	$y = 0.99x + 1$	0.00	-0.9
3	Kolon-Rektum- Karzinome	101	0.63	$y = 1.02x + 1.2$	0.00	-1.2
4	Entzündliche Darmerkrankungen	35	0.87	$y = 0.6 x + 0.75$	0.02	-0.16
5	Darmpolypen	10	0.7	$y = 1.2 x + 1$	0.00	-1.12
6	Mal.abd.Neub. (nicht klass.)	26	0.7	$y = 1.3 x + 0.7$	0.00	-1.23
7	Leber-Ca	28	0.6	$y = 0.6 x + 1.4$	0.06	-0.57
8	Leberzirrhose	18	0.62	$y = 1.4 x - 0.25$	0.08	-0.92
9	Gallenblasen-Ca	9	0.91	$y = 0.7 x + 1.4$	0.40	-0.92
10	Pankreas-Ca	26	0.9	$y = 0.9 x + 1.5$	0.00	-1.14
11	Prostata-Ca	15	0.3	$y = 0.6 x + 1.7$	0.07	-0.54
12	Gynäkologische Tumoren	16	0.5	$y = 0.7 x + 0.9$	0.00	-0.68
13	Bronchial-Ca	19	0.8	$y = 1.7 x + 0.8$	0.00	-1.88
14	Klin.ges.mal.Tu. (nicht klass.)	24	0.74	$y = 0.8 x + 1$	0.05	-0.44
15	V.a.maligne Neubildung	87	0.48	$y = 1.2 x + 0.9$	0.00	-1.12

Tab. 5 : Daten der untersuchten Diagnosegruppen
(Bereich zwischen 0 und 20 ng CEA/ml)

DIAGNOSE	n	r	AUSGL.GERADE
Mamma-Ca	32	0.99	$y = 0.84 x + 6.5$
Mamma-Ca Tumorst. 4	13	0.99	$y = 0.78 x + 12.2$
Gastrointestinale Tumoren	51	0.82	$y = 1.4 x + 8.0$
Kolon-Rektum- Karzinome	28	0.8	$y = 1.4 x + 18.0$
Leber-Ca	10	0.86	$y = 0.8 x + 19.2$

Tab. 6 : Daten der untersuchten Diagnosegruppen
(Bereich zwischen 2.5 und 1000 ng CEA/ml)

Aufgrund dieser Ergebnisse lassen sich folgende Feststellungen treffen:

1. Im direkten Meßbereich beider Methoden (zwischen 0 und 20 ng CEA/ml) schwanken die Korrelationskoeffizienten der einzelnen Diagnosegruppen mit Werten zwischen $r = 0.3$ und $r = 0.91$ beträchtlich.

Zu einer Gruppe mit guter bis ausreichender Korrelation der mit den beiden Methoden gemessenen CEA-Werte gehören folgende Erkrankungen:

Gallenblasenkarzinom	$r = 0.91$
Pankreaskarzinom	$r = 0.9$
Entzündliche Darmerkrankungen	$r = 0.87$
Bronchialkarzinom	$r = 0.8$
Mammakarzinom	$r = 0.78$

Zu einer im Mittelfeld liegenden Gruppe mit noch ausreichender bis schlechter Korrelation gehören folgende Erkrankungen:

Klinisch gesicherte maligne Tumoren (nicht klassifiziert)	$r = 0.74$
Darmpolypen	$r = 0.7$
Maligne abdominale Neubildungen (nicht klassifiziert)	$r = 0.7$
Gastrointestinale Tumoren	$r = 0.68$
Kolon-Rektumkarzinome	$r = 0.63$
Leberkarzinom	$r = 0.6$
Leberzirrhose	$r = 0.62$

Zu einer Gruppe mit schlechter Korrelation gehören:

Gynäkologische Tumoren	$r = 0.5$
Verdacht auf maligne Neubildungen	$r = 0.48$
Prostatakarzinom	$r = 0.3$

Es zeigt sich hier eine gewisse Tendenz zu besseren Korrelationen bei homogenen Diagnosegruppen wie beim Pankreaskarzinom, dem Gallenblasenkarzinom oder dem Bronchialkarzinom. Es sind dies Malignome, bei denen sehr häufig erhöhte CEA-Konzentrationen gefunden werden.

Bei Gruppen mit sehr inhomogenen Erkrankungen, wie z.B. der Diagnosegruppe "Verdacht auf maligne Neubildung", ist die Korrelation zwischen den mit beiden Methoden gemessenen CEA-Werten wesentlich schlechter.

Allerdings muß berücksichtigt werden, daß die Fallzahlen der einzelnen untersuchten Diagnosegruppen sehr unterschiedlich sind.

Im Meßbereich zwischen 2.5 und 1000 ng CEA/ml ergaben sich in den untersuchten Gruppen mit Werten von $r = 0.8$ bis $r = 0.99$ deutlich günstigere Korrelationen zwischen den mit den beiden Methoden gemessenen CEA-Werten, da hier die Vielzahl der mit beiden Methoden im Meßbereich zwischen 0 und 2.5 ng / ml liegenden Untersuchungsergebnisse nicht berücksichtigt wurde .

2. Die Steigungen der jeweiligen Ausgleichsgeraden als Maß für analysenspezifische, proportionale Fehler liegen im direkten Meßbereich (zwischen 0 und 20 ng/ml) für die einzelnen Diagnosegruppen zwischen 0.6 und 1.8 , und im Meßbereich von 2.5 bis 1000 ng/ml zwischen 0.78 und 1.4 .

Der Intercept als Maß für analysenspezifische, konstante Fehler liegt im direkten Meßbereich, bis auf eine Ausnahme (Leberzirrhose) , einheitlich im positiven Bereich mit Werten zwischen 0.2 und 1.7 , im Meßbereich über 2.5 ng/ml liegt der Intercept zwischen 6.5 und 19.2 .

Somit sind die methodischen Differenzen diagnoseunabhängig auf eine Kombination aus konstantem und proportionalem Fehler zurückzuführen.

Es muß aber betont werden, daß auch hier eine eindeutige Interpretation wegen der teilweise schlechten Korrelationen und der vorwiegend im unteren Konzentrationsbereich liegenden CEA-Wertepaare nur sehr bedingt möglich ist.

3. Für alle Diagnosegruppen bestätigt sich, daß die mit dem RIA gemessenen Werte niedriger liegen als die Vergleichswerte im EIA.

Auch der Wilcoxon-Paardifferenzentest ergab bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % für die Mehrzahl der Diagnosegruppen einen signifikanten Unterschied beider Methoden.

Im Meßbereich unter 20 ng/ml zeigten lediglich die Diagnosegruppen Leberkarzinom, Leberzirrhose und Prostatakarzinom, im Meßbereich zwischen 2.5 und 1000 ng/ml die Diagnosegruppen Mammakarzinom (Tumorstadium 4) sowie Leberkarzinom keinen signifikanten Unterschied. Das Fehlen signifikanter Unterschiede innerhalb dieser Diagnosegruppen im Wilcoxon-Paardifferenzentest dürfte auf die geringen Fallzahlen zurückzuführen sein.

4. Werden die Ergebnisse innerhalb der Diagnosegruppe Mammakarzinom nach dem Tumorstadium differenziert und in die Gruppen Tumorstadium 2 und 3 bzw. Tumorstadium 4 eingeteilt, so zeigt sich, daß bei metastasierenden Tumoren die Ausgleichsgerade eine höhere Steigung als im Tumorstadium 2 bzw. 3 aufweist.

Diese Tendenz des EIA zu höheren CEA-Werten bei fortgeschrittenem Tumorstadium kommt auch in der größeren mittleren Differenz korrespondierender Wertepaare zum Ausdruck (Tab. 7).

Inwieweit diese Beobachtung auf ein unterschiedliches Verhalten beider Immunoassays bei fortgeschrittenem Tumorstadium zurückzuführen ist, muß jedoch in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

DIAGNOSE	N	AUSGLEICHSGERADE	R	$MW\Delta_{RIA-EIA}$
MAMMAKARZINOM TUMORSTADIUM 2/3	55	$y = 1.19x + 0.68$	0.89	-1.17
MAMMAKARZINOM TUMORSTADIUM 4	19	$y = 1.8 x + 0.2$	0.73	-2.5

Tab. 7: Daten der Diagnosegruppe Mammakarzinom

Zusammenfassend zeigt diese diagnosespezifische Auswertung der Untersuchungsergebnisse, daß die mit den beiden Assay-Methoden gemessenen, differierenden CEA-Konzentrationen identischer Proben nicht auf Abhängigkeiten von einzelnen Diagnosegruppen beruhen.

Werden die Untersuchungsergebnisse beider Methoden bei gesicherten Tumoren vereinfacht allein nach dem für klinische Fragestellungen wichtigen Entscheidungskriterium "innerhalb des Referenzbereiches" oder "außerhalb des Referenzbereiches" gruppiert, so zeigen sich in Einzelfällen Differenzen: Während eine der beiden Assay-Methoden (RIA bzw. EIA) einen pathologischen Befund ergab, lag der mit der anderen Methode gemessene CEA-Wert unterhalb der Referenzbereichsgrenze Gesunder (Tab. 8).

DIAGNOSEGRUPPE	RIA-WERT PATHOL. (n)	EIA-WERT PATHOL. (n)
Mammakarzinom	1	5
Gastrointestinale Tumoren	1	7
Leberkarzinom	0	4
Gallenblasenkarzinom	0	1
Pankreaskarzinom	0	1
Prostatakarzinom	0	2
Bronchialkarzinom	0	1
Entzündliche Darmerkrankungen	1	1
Darmpolypen	0	1
Leberzirrhose	1	1

Tab. 8: Anzahl der Meßergebnisse, die nur mit einer der beiden Assaymethoden einen im pathologischen Bereich liegenden CEA-Wert ergaben

Bei dieser Untersuchung fällt auf, daß bei malignen Erkrankungen der EIA dem RIA gegenüber einen geringfügig höheren Prozentsatz richtig-positiver Ergebnisse aufweist. Dagegen führen bei benignen Erkrankungen beide Assays zu keiner wesentlich unterschiedlichen diagnostischen Interpretation der Untersuchungsbefunde.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das carcinoembryonale Antigen (CEA) gehört neben dem alpha-fetoprotein zu den bekanntesten und für die Verlaufsbeurteilung maligner Tumoren bedeutsamsten tumorassoziierten Antigenen.

Wegen der niedrigen CEA-Konzentrationen im Serum wurden bislang praktisch ausschließlich radioimmunologische Bestimmungsmethoden eingesetzt. Die weiteste Verbreitung fand die einen arbeitsaufwendigen Dialyseschritt erfordernde Methode nach HANSEN (kommerziell erhältlich als CEA Roche RIA Test). Die mit den radioimmunologischen Verfahren verbundene Problematik bezüglich des Umgangs mit radioaktiv markiertem Material hat zur Entwicklung eines neuen, methodisch einfacheren, enzymimmunologischen CEA-Bestimmungsverfahrens geführt (Abbott CEA-EIA-Test). Da in diesem Enzymimmunoassay (EIA) Antigen- und Antikörperpräparationen zur Anwendung kommen, die mit den Radioimmunoassay-Reagenzien nicht identisch sind, war eine Vergleichsuntersuchung zwischen RIA und EIA von besonderem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit wird zu folgenden Fragen Stellung genommen: Empfindlichkeit und Meßbereich, Präzision, Referenzbereich und Praktikabilität des EIA. Ferner wurde anhand von 1010 Plasmaproben die Vergleichbarkeit der Meßergebnisse von RIA und EIA untersucht.

Daneben sollte geprüft werden, ob differierende Meßergebnisse bei identischen Proben auf Abhängigkeiten von einzelnen Diagnosegruppen beruhen. Dazu wurden die CEA-Wertepaare für 15 Diagnosegruppen getrennt ausgewertet. Der Referenzbereich des CEA-EIA wurde anhand der Befunde von 144 klinisch und laborchemisch gesunden Personen festgelegt.

Die untere Nachweisgrenze des EIA liegt bei 0.5 ng/ml und entspricht damit dem RIA. Der Meßbereich des EIA (0.5 bis 60 ng/ml) ist deutlich größer als der des RIA (0.5 bis 20 ng/ml). Je nach Konzentrationsbereich ergeben sich für den EIA in der Intra-

assay-Varianz Variationskoeffizienten zwischen 4.3 und 6.9 %, für die Interassay-Varianz Werte zwischen 6.4 und 21.8 %. Diese Ergebnisse sind besser als die eigenen Vergleichsdaten mit dem RIA.

Der Referenzbereich des EIA (0.3 bis 3.0 ng/ml) entspricht im Wesentlichen dem des RIA.

Im Meßbereich unter 20 ng/ml sind die CEA-Werte aus RIA und EIA nur bedingt vergleichbar ($r=0.72$), im Konzentrationsbereich über 2.5 bis 1000 ng/ml beträgt der Korrelationskoeffizient lediglich 0.61. Die RIA-Werte liegen im Mittel um 1 ng/ml niedriger.

Die unterschiedlichen Meßergebnisse sind nach unseren Untersuchungen auf immunologische Differenzen (Standardpräparationen, Antiseren) bzw. methodische Differenzen (Vorbehandlung der Proben, Dialyse) zurückzuführen. Neben einer besseren Präzision bietet der EIA insbesondere bezüglich der Praktikabilität gegenüber dem RIA eindeutige Vorteile.

Für 15 untersuchte Diagnosegruppen (maligne sowie benigne Erkrankungen) schwanken die Korrelationskoeffizienten der einzelnen Gruppen beträchtlich (im direkten Meßbereich unter 20 ng/ml von $r=0.3$ bis $r=0.91$). Die Steigungen der jeweiligen Ausgleichsgeraden variieren zwischen 0.6 und 1.8, der Intercept liegt bis auf eine Ausnahme im positiven Bereich. Die methodischen Differenzen sind somit diagnoseunabhängig und auf eine Kombination aus konstantem und proportionalem Fehler zurückzuführen. Bei der Mehrzahl der Diagnosegruppen wurden mit dem RIA statistisch signifikant niedrigere CEA-Werte als mit dem EIA gemessen.

Nach unseren Ergebnissen ist die enzymimmunologische CEA-Bestimmung für die Routine geeignet. Sie weist gegenüber dem RIA methodische Vorteile auf. Wegen der begrenzten Korrelation und der in Einzelfällen deutlichen Diskrepanzen ist es aber notwendig, im Rahmen der Therapiekontrolle individueller Tumorpazienten nur eine der beiden Methoden einzusetzen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALEXANDER, P. :
Foetal "antigens" in cancer.
Nature (Lond.) 235, 137 (1972)
2. ASHMAN, L.K., LUDBROOK, J., MARSHALL, V.R. :
Probablistic application of plasma carcinoembryonic
antigen assay in cancer patients.
British Medical Journal 2, 721 (1975)
3. BAND, P. , HYDE, H. , FELDSTEIN, M. , MC PHERSON, T. ,
PATWARDHAN, V. :
Carcinoembryonic antigen (CEA) : a comparison of the FARR
and Z-gel methods for CEA detection in benign and malign-
ant diseases.
Eur.J.Cancer 9, 597 (1973)
4. BANJO, C. , GOLD, P. , FREEDMAN, S.O. , KRUPPEY, J. :
Structure of the immunodominant tumor grouping of carcino-
embryonic antigen (CEA) of the human digestive system.
Fed.Proc., 32, 1007 (1973)
5. BANJO, C. , GOLD, J.M. , SHUSTER, J. , GOLD, P. :
Carcinoembryonic antigen - immunochemistry, physical
chemistry and clinical implications.
Isr.J.Med.Sci., 10, 856 (1974)
6. BANJO, C. , SHUSTER, J. , GOLD, P. :
Intermolecular heterogeneity of the carcinoembryonic antigen.
Cancer Res., 34, 2114 (1974)

7. BEYER, H.K. :
Carcinoembryonales Antigen (CEA) - Ein Vergleich zweier
Untersuchungsmethoden.
Nuc.Compact , 10, 60 (1979)
8. BHARGAVA, A.K. , HARVEY, S.R. , CHU, T.M. :
N-terminal sequence of the glycoprotein associated with
carcinoembryonic antigen (CEA) activity.
Clin.Res. , 22, 484 (1974)
9. BORDES, M. , MICHIELS, R. , MARTIN, F. :
Detection by immunofluorescence of carcinoembryonic antigen
in colonic carcinoma, other malignant or benign tumors,
and non cancerous tissue.
Digestion , 9, 106 (1973)
10. BRUNNER, K.T. :
Immunologie und Krebs.
Schweiz.med.Wschr. 103 , 1249 (1973)
11. BURKHARD, M. , JAQUET, H. , DE RHAM, O. , FRITSCH, R. ,
HOLBURN, A. , MACH, J.P. :
Carbohydrate analysis of carcinoembryonic antigens con-
taining different blood group specificities.
Experientia 29 , 751 (1973)
12. BURTIN, P. , KLEIST, S.VON :
Die Karzinoembryonalen Antigene der menschlichen Tumoren.
Triangel (De.) 11, 123 (1973)
13. BURTIN, P. , KLEIST, S.VON , SABINE, M.C. , KING, M. :
Immunohistological localization of carcinoembryonic
antigen and nonspecific cross-reacting antigen in gastro-
intestinal normal and tumoral tissues.
Cancer Res. 33 , 3299 (1973)

14. CEA-ROCHE carcinoembryonic antigen assay :
An in vitro test to aid in the management and diagnosis
of cancer. A clinical monograph.
Roche Diagnostics, Roche Clinical Laboratories,
Nutley, N.Y. (1974)
15. CHU, T.M. :
Current status of carcinoembryonic antigen assay.
Semin. Nucl. Med. 5, 255 (1975)
16. CHU, T.M. , REYNOSO, G. :
Evaluation of a new radioimmunoassay method for carcino-
embryonic antigen in plasma, with the use of zirconyl
phosphate gel.
Clin. Chem. 18 , 918 (1972)
17. CHU, T.M. , REYNOSO, G. , HANSEN, H.J. :
Demonstration of carcinoembryonic antigen in normal
human plasma.
Nature 238 , 152 (1972)
18. COLIGAN, J.E. , HENKART, P.A. , TODD, C.W. , TERRY, W.D. :
Heterogeneity of the carcinoembryonic antigen.
Immunochemistry 10 , 591 (1973)
19. COLIGAN, J.E. , LAUTENSCHLEGER, J.T. , EGAN, M.L. , TODD, C.W. :
Isolation and characterization of carcinoembryonic antigen.
Immunochemistry 9 , 377 (1972)
20. A collaborative study of a test for carcinoembryonic
antigen (CEA) in the sera of patients with carcinoma of
the colon and rectum.
A joint National Cancer Institute of Canada/American
Cancer Society investigation,
Can. Med. Assoc. J. 107 , 25 (1972)

21. CONCANNON, J.P. , DALBOW, M.H. , VANDEVOORDE, J. , FRICH, J.C. ,
WEIL, C.S. , HEADINGS, J. :
A comparison of the interlaboratory reproducibility of
the Hansen radioimmunoassay for carcinoembryonic antigen.
Ann.Clin.Sci. 4 , 151 (1974)

22. CURRIE, G.A. :
Eighty years of immunotherapy : a review of immunological
methods used for the treatment of human cancer.
Brit.J.Cancer 26 , 141 (1972)

23. DARCY, D.A. :
Immunological study of CEA and related antigen.
Ann.Immunol.(Inst.Pasteur) 124 C , 595 (1973)

24. DELACROIX, D.L. , TOME, G. , FIASSE, R. , DIVE, C.H. :
Acid and heat extraction in CEA assays:
Comparison between the Roche and Abbott CEA RIA Tests
in patients with various types of tumor .
Tumor Diagnostik 2 , 172 (1981)

25. DONOHUE, D.D. , VANDEVOORDE, J.P. :
CEA-like activity in body fluids.
Clin.Res. 23 , 338A (1975)

26. DYCE, B.J. , HAVERBACK, B.J. :
Free and bound carcinoembryonic antigen in neoplasms
and in normal adult and fetal tissue.
Immunochemistry 11 , 423 (1974)

27. EGAN, M.L. , COLIGAN, J.E. , TODD, C.W. :
Radioimmune assay for the diagnosis of human cancer.
Cancer Suppl. 34 , 1504 (1974)
28. EGAN, M.L. , LAUTENSCHLEGER, J.T. , COLIGAN, J.E. , TODD, C.W. :
Radioimmune assay of carcinoembryonic antigen.
Immunochemistry 9 , 289 (1972)

29. EVELEIGH, J.W. :
Heterogeneity of carcinoembryonic antigen.
Cancer Res. 34 , 2122 (1974)
30. FARR, R.S. :
A quantitative immunochemical measure of the primary
interaction between J-BSA and antibody.
J. Infect. Dis. 103, 239 (1958)
31. FELDMAN, U. , SCHNEIDER, B. , KLINKERS, H. , HAECKEL, R. :
A multivariate approach for the biometric comparison
of analytical methods in clinical chemistry.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem 19 , 121 (1981)
32. FLEISHER, M. , BESENFELDER, E. , OETTGEN, H.F. , SCHWARTZ, M.K. :
Comparison of carcinoembryonic antigen (CEA) methodologies.
Ann. Clin. Lab. Sci. 4 , 357 (1974)
33. FOLEY, E.J. :
Antigen properties of methylcholanthrene-induced tumors
in mice of strain of origin.
Cancer Res. 30 , 835 (1953)
34. FRACKELTON, A.R. , SZARO, R.P. , WELTMAN, J.E. :
A galactosidase immunosorbent test for carcinoembryonic
antigen.
Cancer Res. 36 2845 (1976)
35. FUKS, A. , BANJO, C. , SHUSTER, J. , FREEDMAN, S.O. , GOLD, P. :
Carcinoembryonic antigen (CEA): Molecular biology and
clinical significance .
Biochim. Biophys. Acta 417 , 123 (1975)
36. GALLMEIER, W.M. , OETTGEN, H.F. :
Tumorummunologie. Virusinduzierte Tumoren.
Dtsch. Med. Wschr. 93 , 1114 (1968)

37. GOLD, P. :
Embryonic origin of human tumorspecific antigens.
Prog.Exp.Tumor Res. (Basel) 14 ,43 (1971)
38. GOLD, P. :
The role of immunology in human cancer research.
Canad.Med.Ass.J. 103 ,1043 (1970)
39. GOLD, P.,FREEDMAN,S.O. :
Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system.
J.Exp.Med. 122, 467 (1965)
40. GOLD, P.,FREEDMAN,S.O. :
Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques.
J.Exp.Med. 121, 439 (1965)
41. GOLD,J.M. ,FREEDMAN,S.O. ,GOLD,P. :
Human anti-CEA antibodies detected by radioimmuno-electrophoresis.
Nat.New.Biol. 239 , 60 (1972)
42. GOLD,J.M. ,GOLD,P. :
The blood group A-like site in carcinoembryonic antigen.
Cancer Res. 33 , 2821 (1973)
43. GOLD,P. ,GOLD,J.M. ,FREEDMAN,S.O. :
Cellular location of carcinoembryonic antigens of the human digestive system.
Cancer Res. 28 , 1331 (1968)
44. GOLD,P. ,KRUPEY,J. ,ANSARI,H :
Position of the carcinoembryonic antigen of the human digestive system in ultrastructure of tumor cell surface.
J.Natl.Cancer Inst. 45 ,219 (1970)

45. HAKKINEN, I.P.T. :
Immunological relationship of the carcinoembryonic antigen
and the fetal sulfoglycoprotein antigen.
Immunochemistry 9 ,1115 (1972)
46. HABEL, K. :
Immunologic aspects of oncogenesis by polyoma virus.
In: Conceptual advances in immunology and oncology
New York:Harper and Row, Publ. 1963, pp. 486-495
47. HANSEN, H.J. , HAGER, H.J. , COHEN, H. , KRUPPEY, J. :
Induction of an antisera monospecific for carcinoembry-
onic antigen.
Clin.Res. 19 . 53 (1971)
48. HANSEN, H.J. , LANCE, K.P. , KRUPPEY, J. :
Demonstration of an ionsensitive antigenic site on carci-
noembryonic antigen using zirconyl phosphate gel.
Clin.Res. 19 ,143 (1971)
49. HANSEN, H.J. , SNYDER, J.J. , MILLER, E. , VANDEVORDE, J.P. ,
MILLER, O.N. , HINES, L.A.R. , BURNS, J.J. :
Carcinoembryonic antigen (CEA) assay.
A laboratory adjunct in the diagnosis and management of
cancer.
Hum.Pathol. 5 ,139 (1974)
50. HELLSTRÖM, L. , HELLSTRÖM, K.E. , SJÖGREN, H.O. , WARNER, G.A. :
Demonstration of cell-mediated immunity to human neo-
plasms.
Int.J.Cancer 7; 1(1971)
51. HOLBURN, A.M. , MACH, J.P. , MAC DONALD, D. , NEWLANDS, M. :
Studies of the association of A,B and Lewis blood group
antigens with carcinoembryonic antigen (CEA).
Immunology 26 ,831 (1974)

52. HRAI, H. :
A collaborative clinical study of carcinoembryonic antigen in Japan.
Cancer Res. 13, 299 (1973)
53. ITO, S. :
Structure and function of the glycocalix.
Fed.Proc. 28, 12 (1969)
54. KHOO, S.K. , WARNER, N.L. , LIE, J.T. , MACKAY, I.R. :
Carcinoembryonic antigen activity of tissue extracts :
A quantitative study of malignant and benign neoplasms,
cirrhotic liver, normal adult and fetal organs.
Int.J.Cancer 11, 681 (1973)
55. KIM, Y.D. , TOMITA, J.T. , SCHENCK, J.R. , MOELLER, C. , WEBER, G.F.,
HIRATA, A.A. :
Extraction of human plasma or sera by heat treatment for
a solid-phase radioimmunoassay for carcinoembryonic antigen.
Clinical Chemistry 25 , 773 (1979)
56. KIMBALL, P.M. , BRATTAIN, M.G. :
A comparison of methods for the isolation of carcinoembryonic antigen.
Cancer Res. 38 , 619 (1978)
57. KLEIST, S.V. , CHAVANEL, G. , BURTIN, P. :
Identification of an antigen from normal human tissue that
cross-reacts with the carcinoembryonic antigen.
Proc.Nat.Acad.Sci.(Wash.) 69 , 2492 (1972)
58. KOLDOVSKY, P. :
Tumor specific transplantation antigen.
In: Recent results in cancer research , Nr.22 ,
Berlin-Heidelberg, New York :Springer 1969

59. KRUPPEY, J. , GOLD, P. , FREEDMAN, S.O. :
Purification and characterization of carcinoembryonic
antigens of the human digestive system.
Nature (Lond.) 215 , 67 (1967)
60. KRUPPEY, J. , GOLD, P. , FREEDMAN, S.O. :
Physicochemical studies of the carcinoembryonic antigens
of the human digestive system.
J.Exp.Med. 128 , 387 (1968)
61. KUPCHIK, H.Z. , ZAMCHECK, N. :
Carcinoembryonic antigen in liver disease .Isolation from
human cirrhotic liver and serum and from normal liver.
Gastroent. 63 , 95 (1972)
62. KUPCHIK, H.Z. , ZAMCHECK, N. , SARAIVIS, C.A. :
Immunochemical studies of carcinoembryonic antigens:
Methodologic considerations and some clinical implications.
J.Nat.Cancer Inst. 52 , 1741 (1973)
63. LAMERZ, R. , FATEH-MOGHADAM, A. :
Carcinofetale Antigene II .
Carcinoembryonales Antigen(CEA).
Klin.Wschr. 53 , 193 (1975)
64. LAURENCE, D.J.R. , NEVILLE, A.M. :
Foetal antigens and their role in the diagnosis and cli-
nical management of human neoplasms.A review.
Brit.J.Cancer 26 , 335 (1972)
65. LAURENCE, D.J.R. , STEVENS, U. , BETTELHEIM, R , DARCY, D. , LEESE,
C. , TURBERVILLE, C. , ALEXANDER, P. , JOHNS, E.W., NEVILLE, A.M.:
Role of plasma carcinoembryonic antigen in diagnosis of
gastrointestinal, mammary and bronchial carcinoma.
Br.Med.J. 3 , 605 (1972)

66. LAURENCE,D.J.R. ,STEVENS,U. ,DARCY,D. ,TURBERVILLE,C. ,
NEVILLE,A.M. :
Assay of the carcinoembryonic antigen by a double anti-
body radioimmunoassay and the development of an assay
for non-specific cross reacting antigen.
Radioimmunoassay Related Procedures Medicine 2 ,275(1974)
67. LEHMANN,F.G. :
Tumorantigene
Dtsch.Med.Wschr. 99 ,410 (1974)
68. LEUTE,R.K. ,ORTH,H.D. :
Prinzip und Anwendung des homogenen Enzymimmunoassays
(EMIT)
In:Enzymimmunoassay,Grundlagen und praktische Anwendung,
W.Vogt (Thieme,Stuttgart) , 10 (1978)
69. LO GERFO,P. ,HERTER,F.P. ,BENNET,S.J. :
Absence of circulating antibodies to carcinoembryonic
antigen in patients with gastrointestinal malignancies.
Int.J.Cancer 9 ,344 (1972)
70. LO GERFO,P. ,KRUPPEY,J. ,HANSEN,H.J. :
Demonstration of an antigen common to several varieties
of neoplasia.
New Engl.J.Med. 285 ,138 (1971)
71. MACH,J.P. ,PUSZTAZIERI,G. :
Carcinoembryonic antigen (CEA): Demonstration of partial
identity between CEA and a normal glycoprotein.
Immunochemistry 9 , 1031 (1972)
72. MAIOLINI,R. ,BAGREL,A. ,CHAVANCE,C. ,KREBS,B. ,HERBETH,B.,
MASSEYEFF,R. :
Study of an enzyme immunoassay kit for carcinoembryonic
antigen.
Clinical Chemistry 26,1718(1980)

73. MARTIN, F. :
Cancer- and organspecificity of the carcinoembryonic antigen.
In: The role of immunological factors in viral and oncogenic processes, BEERS, R.F.; JR. , TILGHAM, R.C. , BASSETT, E.G., Johns Hopkins University Press, Baltimore, 381 (1974)
74. MARTIN, F. , DEVANT, J. :
Carcinoembryonic antigen in normal human saliva.
J. Natl. Cancer Inst. 50 , 1375 (1973)
75. MARTIN, F. , JAMES, K. , HURTUBISE, P. :
The use of CEA as an early indicator for gastrointestinal tumor recurrence and second look processes.
Cancer 39 , 440 (1977)
76. MILLER, A.B. :
The joint National Cancer Institute of Canada / American Cancer Society study of a test for carcinoembryonic antigen (CEA).
Cancer, Suppl. 34 , 932 (1974)
77. MOORE, T. , KUPCHIK, H. , MARCON, N. , DHAR, P. , ZAMCHECK, N. :
Carcinoembryonic antigen (CEA) in the evaluation of gastrointestinal malignancy.
Clin. Res. 18 , 680 (1970)
78. MOORE, T. , KUPCHIK, H. , MARCON, N. , ZAMCHECK, N. :
Carcinoembryonic antigen assay in cancer of the colon and pancreas and other digestive tract disorders.
Am. J. Dig. Dis. 16 , 1 (1971)
79. MORTON, D.L. , MALMGREEN, R.A. , HALL, W.T. , SHIDLOVSKY, G. :
Immunologic and virus studies with human sarcomas.
Surgery 66 , 152 (1969)

80. NAGEL, G.A. , GEIGER, C. :
Krebs und Immunität.
Schweiz.med.Wschr. 101 ,1605 (1971)
81. NEVILLE, A.M. :
Carcinoembryonic antigen-the current status.
Arch.Pathol.Lab.Med. 105 ,281 (1981)
82. NEVILLE, A.M. , LAURENCE, D.J.R. :
Report of the workshop on the carcinoembryonic antigen
(CEA) :The present position and proposals for future
investigation.
Int,J.Cancer 14 ,1 (1974)
83. NEUMEIER, D. , GLÜCK, B. , FATEH-MOGHADAM, A. , KNEDEL, M. :
Methodische Durchführung und Ergebnisse der Qualitäts-
kontrollversuche der CEA-Bestimmung unter Verwendung
eines kommerziellen Radioimmunoassay-Kits.
In: F.G. LEHMANN. Tumorantigene in der Gastroenterologie
München, Karl Demeter (1976)
84. NEWMAN, E.S. , PETRAS, S.E. , GEORGIADIS, A. , HANSEN, H.J. :
Interrelationship of carcinoembryonic antigen and colon
carcinoma antigen III.
Cancer Res. 34 ,2125 (1974)
85. NIH Consensus Development Conference CEA (Carcinoembry-
onic Antigen):
Its role as a marker in the management of cancer.
Ann.Int.Med. 94 , 407 (1981)
86. OFHR, P. , BODENBERGER, A. , KUNATH, U. :
Study of a new enzymatic assay (EIA) for quantitative
measurement of CEA and its clinical applicability.
In: Carcinoembryonic Proteins, Vol II, Ed. F.G. LEHMANN,
841 (1979)

87. OEHR, P. , SCHLÖSSER, T. , ADOLPHS, H.D. :
Anwendbarkeit eines enzymatischen Tests zur Bestimmung
von CEA im Serum und CEA-ähnlichen Substanzen im Urin
bei Patienten mit Harnblasentumoren.
Tumor Diagnostik 1 , 40 (1980)
88. ONIZAWA, S. , WATANABE, S. , YAGURA, T. :
Radioimmunoassay of carcinoembryonic antigen and clinical
significance of its level in plasma.
Gann. 67 , 371 (1971)
89. PASTERNAK, G. :
Neue Aspekte der immunologischen Krebsforschung.
Dtsch. Ges. Wesen 18 , 1705 (1963)
90. PASTERNAK, G. :
Immunologische Eigenschaften chemisch und physikalisch
induzierter Tumoren.
Arch. Geschw. Forsch. 29 , 113 (1967)
91. PERSIJN, J.P. , KORSTEN, C.B. :
The development of a radioimmunoassay for carcinoembry-
onic antigen with some applications.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 14 , 377 (1976)
92. Procedure Manual, CEA-Roche, Carcinoembryonic antigen assay,
Roche Diagnostics, Roche Clinical Laboratories, Nutley,
N.Y. , (1974)
93. Progress report
Carcinoembryonic antigen (CEA).
Gut 13 , 1000 (1972)
94. PUSZTASZERI , G. , MACH, J.P. :
Carcinoembryonic antigen (CEA) in non digestive cancerous
and normal tissues.
Immunochemistry 10 , 197 (1973)

95. REYNOSO,G. ,CHU,T.M. ,HOLYOKE,D. ,COHEN,E. ,NEMOTO,T. ,
WANG,J.J. ,CHUANG,J. ,GUINAN,P. ,MURPHY,G.P. :
Carcinoembryonic antigen in patients with different cancers.
J.Am.Med.Ass. 220 ,361 (1972)
96. RODBARD,D. ,RATFORD,P.L. ,COOPER,J. ,ROSS,G.T. :
Statistical quality control of radioimmunoassays.
J.Clin.Endocr. 29 , 352 (1968)
97. Rogers,G.T. :
Heterogeneity of carcinoembryonic antigen.
Implications on its role as a tumor marker substance.
Bioch. et Biophys. Acta 458 , 355 (1976)
98. ROSE,S.P. ,JOLLEY,M.E. ,WAINDLER,L.M. ,et al. :
A sensitive solid phase enzyme immunoassay for carcinoem-
bryonic antigen.
Abstracts of the 6th Meeting,International Research Group
for Carcinoembryonic Proteins , Sept. 1978 .p. 207
99. RULE,A.H. ,GOLESKI-REILLY,C.:
Carcinoembryonic antigen (CEA) :Seperation of CEA-reacting
molecules from tumor,fetal gut,meconium and normal colon.
Immunol.Comm. 2 , 213 (1973)
100. RULE,A.H. ,STRAUS,E. ,VANDEVORDE,J. ,JANOWITZ,H.D. :
Tumor-associated (CEA-reacting) antigen in patients with
inflammatory bowel disease.
New Engl.J.Med. 287 ,24 (1972)
101. SCHUURS,A.H.W.M. ,VAN WEEMEN ,B.K. :
Enzyme-Immunoassay
Clinica Chimica Acta 81 .1 (1977)

102. SCHUURS, A.H.W.M. , VAN WEEMEN, B.K. :
Prinzip des heterogenen Enzymimmunoassays (EIA oder ELISA).
In : Enzymimmunoassay. Grundlagen und praktische Anwendung,
W.Vogt (Thieme, Stuttgart), 4 (1978)
103. SEARLE, F. , LOVESEY, A.C. , ROBERTS, B.A. :
Radioimmunoassay methods for carcinoembryonic antigen.
J.Immunol.Methods 4 , 113 (1974)
104. SIMMONS, D.A.R. , PERLMAN , P. :
Carcinoembryonic antigen and blood group substances.
Cancer Res. 33 , 313 (1973)
105. SJÖGREN, H.O. :
Studies on immunologically determined host resistance
against virus induced neoplasms.
Thesis, Karolinska Institutet, Stockholm (1964)
106. SLAYTER, H.S. , COLIGAN, J.E. :
Electron microscopy and physical chracterization of the
carcinoembryonic antigen.
Biochemistry 14, 2323 (1975)
107. SOROKIN, J.J. , KUPCHIK, H.Z. , ZAMCHECK, N. , DHAR, P. :
A clinical comparison of two radioimmunoassays for car-
cinoembryonic antigen (CEA).
Immunol.Comm. 1 , 11 (1972)
108. TERRY, W.D. , HENKART, P.A. , DAS, S. , COLIGAN, J.E. , TODD, C.W. :
Characterization of human carcinoembryonic antigens.
In: The Role of Immunological Factors in Viral and Onco-
genic Processes
BEERS, R.F.; Jr. , TILGHMAN, R.C. , BASSETT, E.G.
Johns Hopkins University Press, Baltimore , 241 (1974)

109. TERRY,W.D. ,HENKART,P.A. ,COLIGAN,J.E. ,TODD,C.W. :
Structural studies of the major glycoprotein in preparations with carcinoembryonic antigen activity.
J.Exp.Med. 136 ,200 (1972)
110. TERRY,W.D. ,HENKART,P.A. ,COLIGAN,J.E. ,TODD,C.W. :
Carcinoembryonic antigen:Charakterization and clinical applications.
Transplant.Rev. 20 ,100 (1974)
111. THOMPSON,D.M.P. ,KRUPEY,J. ,FREEDMAN,S.O. ,GOLD,P. :
The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen in the human digestive system.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 64 ,161 (1969)
112. TODD,C.W. :
Carbohydrate structure of CEA.
Trans.N.Y.Acad.Sci. 36 ,824 (1974)
113. TURBERVILLE,C. ,DARCY,D.A. ,LAURENCE,D.J. ,JOHNS,E.W. ,
NEVILLE,A.M. :
Studies on carcinoembryonic antigen (CEA) and a related glycoprotein CCEA₂ .Preparation and chemical charakterization.
Immunochemistry 10 ,841 (1973)
114. VRBA,R. ,ALPERT,E. ,ISSELBACHER,K.J. :
Carcinoembryonic antigen:Evidence for multiple antigenetic determinants and isoantigens.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 72 , 4602 (1975)
115. WAGENER,C. ,BREUER,H. :
Comparative studies on the radioimmunological determination of carcinoembryonic antigen in tumor tissue.
J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 16 ,323 (1978)

116. WAGENER, C. , BREUER, H. :
Factors affecting the radioimmunological determination
of carcinoembryonic antigen in human plasma.
J.Clin.Com.Clin.Biochem. 16 , 601 (1978)
117. WINTZER, G. , CORMAN, G. , UHLENBRUCK, G. :
Carcinoembryonales Antigen :
Vergleich der radioimmunologischen und enzymimmunolo-
gischen Bestimmungsmethode in der Therapiekontrolle
kolorektaler Karzinome.
Leber, Magen, Darm 9 , 307 (1979)
118. ZAMCHECK, N. , MOORE, T.L. , DHAR, P. , KUPCHIK, H. :
Immunologic diagnosis and prognosis of human digestive
tract cancer: carcinoembryonic antigens.
New Engl.J.Med. 286 , 83 (1972)

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie am Klinikum Großhadern der Universität München (Direktor: Prof.Dr.med.M.Knedel) durchgeführt.

Für die Gewährung der Arbeitsmöglichkeit an diesem Institut sowie für die Übernahme des Koreferates danke ich Herrn Prof. Dr.med.M.Knedel.

Herrn Prof.Dr.med.A.Fateh-Moghadam bin ich für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die vielen Anregungen bei der Durchführung und die großzügige Unterstützung bei der Abfassung der Arbeit zu besonders großem Dank verpflichtet.

Herrn Priv.Doziert.Dr.med.D.Neumeier danke ich für die wertvolle Hilfe bei den klinisch-chemischen Arbeiten sowie für die Anleitung und den Rat bei der wissenschaftlichen Analyse der Ergebnisse sehr herzlich.

Mein Dank gilt auch Herrn H.Kristin und Frau D.Nagel für ihre Hilfe bei der statistischen Erfassung der Befunde.

Schließlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Bereiches Protein- und Immunchemie für die Unterstützung bei der Einarbeitung in die Analytik und bei der Durchführung der Untersuchungen, und bei Frau J.Ermisch für das Zeichnen der Abbildungsvorlagen bedanken.

LEBENS LAUF

18. 5.1951 geboren in Paderborn als Sohn des Internisten Dr.med.Georg Pape, leitender Arzt des St.Josef-Krankenhauses in Bad Driburg/Westf., und seiner Ehefrau Marianne Pape, geb.Hofmann.
- 1957-1961 Besuch der Volksschule in Bad Driburg.
- Apr. 1961 Eintritt in das humanistische Gymnasium St.Xaver in Bad Driburg.
16. 6.1970 Abitur an diesem Gymnasium.
1. 4.1971-30. 9.1972 Ableistung des Grundwehrdienstes bei der Bundeswehr.
- Okt. 1972 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin.
7. 4.1975 Physikum an der F.U.-Berlin.
21. 4.1976 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der F.U.-Berlin.
- Nov. 1976 Fortsetzung des Studiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
18. 9.1978 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der L.M.U.-München.
- 15.10.1979 Ärztliche Prüfung in München.
- 3.12.1979 Approbation erhalten.
1. 9.1980 Einstellung als wiss.Assistent am Institut für Klinische Chemie am Klinikum Großhadern der Universität München (Direktor: Prof.Dr.med. M.Knedel), wo ich seither tätig bin.

